

Aus der Klinik für Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prof. Dr. HP Schultheiss

während dieser Promotionsarbeit Oberarzt, Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
jetzt ärztlicher Direktor, Kardiologie, Benjamin-Franklin-Klinik, Berlin

**Verantwortliche Faktoren für die veränderte kardiale Isoformexpression
des Adeninnukleotidtranslokators bei Patienten mit
Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tanja Link-Ingenstau

2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Häussinger

Dekan

Referent: Prof. Dr. Schultheiß

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Grabensee

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Virusmyokarditis (MC).....	5
1.2 Pathogenese der MC und DCM und die Bedeutung des ANT für die beiden Krankheitsbilder.....	6
1.3 End- bzw. Folgestadium einer Myokarditis?	7
1.4 Der Adeninnukleotidtranslokator und seine Rolle im Krankheitsbild der viralen Herzerkrankung.....	8
1.5 Problemstellung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Herzkatheterismus.....	16
2.2 Molekularbiologie.....	17
2.2.1 RNA-Extraktion:	17
2.2.2 Reverse Transkription (RT)	18
2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR): Amplifizierung aller ANT-Sequenzen.....	18
2.2.4 Dot-Blot.....	18
2.2.5 Radioaktive 5`Markierung von Oligonukleotiden mit Hilfe der T4 Kinase	19
2.3 Immunhistologie	19
2.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung.....	20
2.3.2 Verwendete Antikörper	20
2.3.3 Immunperoxidasefärbung.....	20
2.4 Nachweis enteroviraler RNA im Myokardgewebe.....	21
2.5 Statistische Methoden	21
3 Untersuchtes Patientenkollektiv.....	24
3.1 Kontrollkollektiv.....	24
3.2 Patienten mit klinisch starkem V. a. Myokarditis.....	24
3.3 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie	24
4 Ergebnisse	26
4.1 Normalbereiche für die einzelnen ANT-Isoformexpressionsanteile im Myokard.....	26
4.2 Zusammenhang hämodynamischer Parameter mit der ANT-Expression	27
4.2.1 Patienten mit klinischem V. a. eine Myokarditis	28
4.2.2 Patienten mit DCM.....	30
4.3 Bedeutung des Entzündungsgrades für die ANT-Expression.....	33
4.4 Bedeutung der myokardialen viralen RNA-Infiltration für die ANT-Expression	35
4.5 Verlaufsbiopsien Teil 1.....	37
4.5.1 Entzündungsgrad.....	38
4.5.2 Virus.....	38
4.6 Bedeutung der Krankheitsdauer für die ANT-Expression.....	38

4.7 Bedeutung des allgemeinen Krankheitszustandes des Patienten für die ANT-Expression	39
4.8 Verlaufsbiopsien Teil 2.....	41
4.8.1 Hämodynamik	41
4.8.2 Krankheitsstadium.....	41
5 Diskussion.....	44
5.1 Eine myokardiale enterovirale Infektion ist mit einer veränderten ANT-Isoformexpression assoziiert.....	44
5.2 Die Rolle der T-zellabhängigen Immunreaktion	45
5.3 Die Hämodynamik und die Krankheitsdauer haben keinerlei Einfluss auf die ANT-Verteilung.....	45
5.4 Ist ein multipel geschädigter Herzmuskel anfälliger für eine ANT-Isoformverschiebung?	46
5.5 Welche Mechanismen beeinflussen die ANT-Isoformexpressionsänderung?	46
5.6 Welche Konsequenzen hat der ANT-Isoformshift für das Myokard und welche prognostischen Aussagen läßt er zu?	47
6 Zusammenfassung	48
7 Literatur	49
8 Anhang	56
8.1 ANT-Verteilung bei Myokarditispatienten.....	56
8.2 ANT-Verteilung bei DCM-Patienten.....	58
8.3 Hämodynamikparameter von Myokarditis-Patienten	59
8.4 Hämodynamikparameter bei DCM-Patienten.....	61
8.5 Histologieverteilung bei Myokarditispatienten.....	62
8.6 Histologieverteilung bei DCM-Patienten	64
8.7 Krankheitsdauer bei MC- und DCM-Patienten	65
8.8 Krankheitsgrade bei MC- und DCM-Patienten	67
8.9 Virusbefall bei MC- und DCM-Patienten.....	69
8.10 Puffer, Lösungen und Medien für die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden:.....	71
8.11 Verwendete Nukleotide und Primer.....	74
8.11.1 Primersequenzen und verwendete Annealingtemperaturen	74
8.11.2 Nukleotidsequenz der zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide	74
8.11.3 Primersequenzen und verwendete Annealingtemperaturen	74
8.11.4 Nukleotidsequenz der zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide	74

1 Einleitung

1.1 Virusmyokarditis (MC)

Der Begriff „Myokarditis“ wurde von *Sobernheim* 1937 eingeführt. Er beschreibt eine kardiale Entzündung, die in unterschiedlichem Umfang die Myozyten, das interstitielle und perivaskuläre Bindegewebe sowie koronare Arteriolen, Kapillaren und - selten - die großen epikardialen Herzkranzarterien einbezieht. Ätiologisch können sie durch Erregerbefall von Rickettsien, Protozoen, Pilze, Bakterien und Viren, infektiös-toxische Prozesse, allergische Reaktionen, systemische Bindegewebserkrankungen, granulomatöse Erkrankungen oder idiopathisch bedingt sein (12, 14, 15, 17).

Die in Europa und in den Vereinigten Staaten verbreitetste Form ist die Virusmyokarditis. Das Spektrum der Viren, welche die Krankheit auslösen können, ist groß. Hierbei spielt die Gruppe der Enteroviren eine wesentliche Rolle. Die wichtigsten Myokarditis verursachenden Enteroviren sind Coxsackieviren vom Typ A und B sowie Echo-Viren mit mehr als 30 Serotypen. Die Enteroviren gehören zur Gruppe der Picornaviren. Diese Familie setzt sich aus den kleinsten (Durchmesser 28 bis 30nm) bekannten RNA-Viren zusammen. Die Viren bestehen aus einem Nukleinsäurekern und einem Proteinmantel mit Isokaederstruktur. Die Vermehrung der Picornaviren findet im Wirt mit Hilfe von doppelsträngiger RNA statt, während das fertige Virion nur einzelsträngige RNA besitzt. (13, 30). Die Enteroviren werden per os aufgenommen und vermehren sich zunächst im lymphatischen Gewebe des Rachenraumes und später vor allem in der Darmwand, wo sie aber in der Regel keine Symptome verursachen. Anschließend erreichen sie ihr Zielorgan über den Blutweg, und es kommt zur Organmanifestation. Letztere tritt allerdings nur in einem kleinen Prozentsatz der Fälle ein; die weitaus meisten Enterovirusinfektionen verlaufen asymptomatisch. Die immer auftretende Virämie ist der Grund, weshalb auch symptomlos auftretende Enterovirusinfektionen eine Immunität hinterlassen. Die manifesten Enterovirusinfektionen verlaufen häufig uncharakteristisch und mit relativ schwach ausgebildeten klinischen Symptomen. Ein und derselbe Virustyp kann dabei eine Vielzahl von Symptomen verursachen und umgekehrt kann ein klinisches Symptom von mehreren Serotypen ausgelöst werden (16).

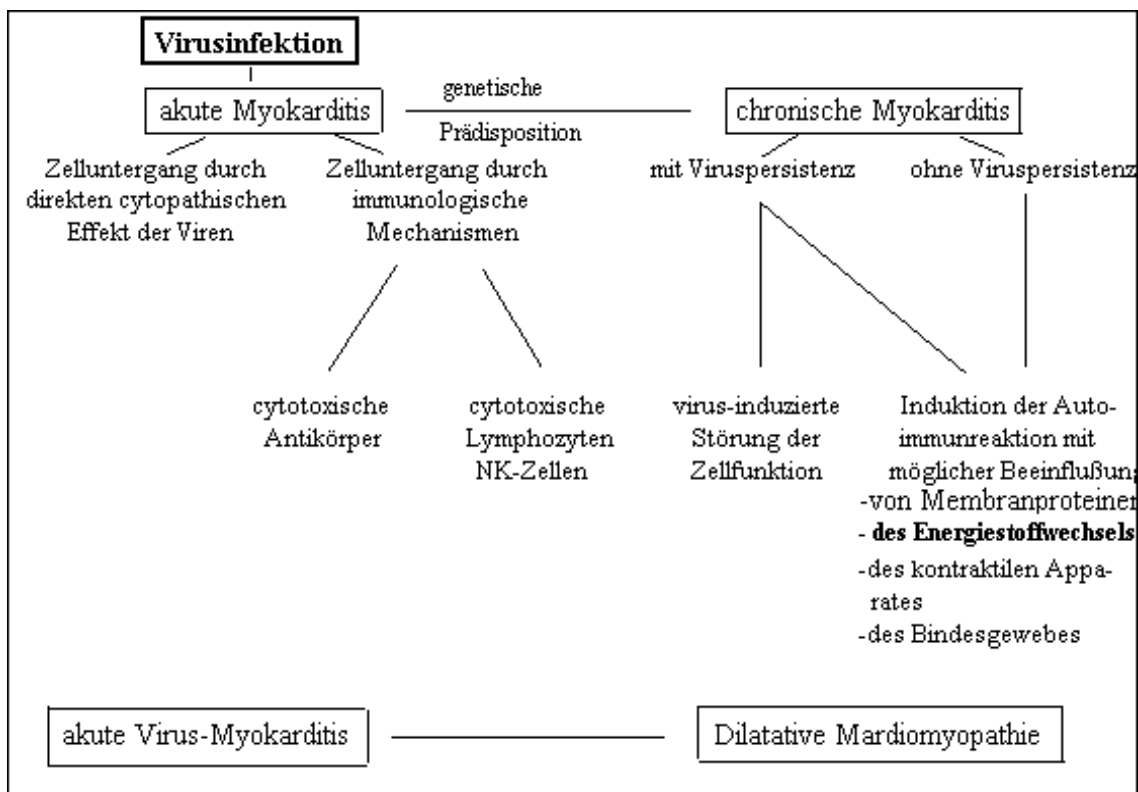
Das klinische Erscheinungsbild der Virusmyokarditis kann sehr vielgestaltig sein. Ein spezifisches Leitsymptom dieser Erkrankung existiert nicht. Im Einzelfall ist die Sicherung der Diagnose oft sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich. Es dominieren allgemeine und kardiale Symptome, die für sich allein wenig charakteristisch sind, aber zusammen mit der spezifischen Diagnostik Gewicht erhalten. Die Beschwerden bestehen in Abgeschlagenheit, Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen, Vergrößerung, Zeichen einer Herzinsuffizienz und Blutbildveränderungen. Teilweise ist die Prognose der Myokarditis - auch wegen der Schwierigkeiten der Diagnostik - ungewiss. In der Mehrzahl der Fälle kommt es zur Ausheilung. Dies gilt auch für histologisch gesicherte Virusmyokarditiden. Es kann jedoch zur langsamen Entwicklung einer Kardiomyopathie, persistierenden Herzrhythmusstörungen und chronischer Herzinsuffizienz kommen. Durch

akute Komplikationen, wie z. B. Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und Herzstillstand, kann die Myokarditis zum Tode führen.

Ungeklärt ist, warum es bei einem Teil der Patienten zu einer Spontanremission kommt, während sich andere kontinuierlich verschlechtern. Aufgrund genetischer Prädisposition ist es theoretisch denkbar, daß der Krankheitsverlauf wesentlich von dem Ausmaß der Autoaggression, die sowohl durch eine Veränderung des Regulationsgleichgewichtes des Immunsystems, als auch durch chronische Veränderungen des Zielgewebes bedingt sein können, bestimmt wird (12, 13). Seltener ist das Krankheitsbild einer Myokarditis nach Infektionen mit Röteln-, Mumps-, Zytomegalie-, Epstein-Barr-, Adeno-, Influenza-A-und-B- und Hepatitis-Viren beschrieben (12, 15, 17).

1.2 Pathogenese der MC und DCM und die Bedeutung des ANT für die beiden Krankheitsbilder

Abb.: 1



Mögliche Pathogenese einer Myokarditis

Heutzutage wird davon ausgegangen, daß die virusbedingte Myokarditis verschiedene Krankheitsstadien durchläuft. In der Akutphase kommt es wahrscheinlich im Rahmen einer aktiven Replikation des Virus zu einem direkten zytotoxischen Effekt mit konsekutiven Zelluntergang und daraus resultierender Störung der myokardialen Funktion. Diesem Stadium des virusinduzierten akuten Gewebsuntergangs folgt eine Infiltration des Myokards durch Monozyten und Makrophagen. Gleichzeitig wird eine Aktivierung des humoralen Immunsystems beobachtet. In einer zweiten Phase kommt es dann zu einer Aktivierung von T-

Lymphozyten, welche in das Myokardgewebe einwandern und sowohl mit myokardialen als auch mit viralen Antigenen reagieren. Bei genetischer Prädisposition, für die es erste tierexperimentelle und klinische Hinweise gibt (20), kann es schließlich zum Übergang von einer normalen infektgetriggerten Immunreaktion zu einem autoimmunologischen Geschehen und damit zu einer Chronifizierung der Erkrankung kommen (20).

Es ist wahrscheinlich, daß es als Folge der Virusinfektion bei gleichzeitiger genetischer Prädisposition zu einem Verlust der Selbsttoleranz mit nachfolgender Autoaggression gegen myokardiale Antigene kommt (21). Neueste experimentelle Daten deuten jedoch darauf hin, daß es im Stadium der Virämie und somit in der Akutphase der Infektion zu einer virusbedingten Zerstörung von Myokardzellen kommt, während in der chronischen Phase wahrscheinlich immunologische Mechanismen für die Progression der Erkrankung verantwortlich sind.

In den 60'iger Jahren wurde nach Auswertung epidemiologischer Daten beschrieben, daß Patienten mit Myokarditis einen erhöhten Titer neutralisierender Antikörper gegen Coxsackieviren der Gruppe B besitzen. Diese Antikörper können auch nach Jahren noch nachgewiesen werden und zeigen einen typischen Titeranstieg während der Infektion. Einen weiteren Anhaltspunkt für die virale Genese der Myokarditis erbrachte der Nachweis viraler Nukleotidsequenzen mittels molekularbiologischer Techniken bei durchschnittlich 50% der Patienten. Trotz dieser epidemiologischen Erkenntnisse ist es häufig sehr schwer, die Virusätiologie einer Myokarditis zu sichern (31, 32, 33).

Ob für das Fortschreiten der Erkrankung im Rahmen des autoimmunologischen Geschehens primär zellulär vermittelte Immunprozesse wesentlich sind oder aber Autoantikörper gegen myokardiale Proteine das entscheidende pathogenetische Prinzip darstellen, ist derzeit noch nicht endgültig geklärt. Zahlreiche Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß zwischen dem histologischen Nachweis zellulärer Infiltrate im Myokard und dem klinischen Verlauf einer Herzmuskelerkrankung keinerlei Korrelation bestehen muß. Es mehren sich jedoch Befunde, die darauf hindeuten, daß der antikörpervermittelten Beeinflussung der myokardialen Zellfunktion eine bedeutende Rolle in der Ätiologie der postviralen Herzmuskelerkrankung zukommen könnte.

In den letzten Jahren ist es gelungen, verschiedene funktionelle Membranproteine, wie den Komplex III der Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran, den Calciumkanal, das Konnexon, den Beta-Rezeptor der Zellmembran, sowie Teile des kontraktilen Apparats (Myosin) als Autoantigene zu identifizieren (20). Der Adeninnukleotidtranslokator ist als Autoantigen besonders gut charakterisiert und spielt in der DCM eine bedeutende Rolle.

1.3 End- bzw. Folgestadium einer Myokarditis?

Definitionsgemäß ist die DCM eine Erkrankung unklarer Genese. Hinsichtlich klinischer und experimenteller Befunde wird die DCM zunehmend als ein mögliches Endstadium einer chronischen MC diskutiert (14, 21, 22).

Bei der DCM kommt es zu einer zunehmenden Dilatation des Herzens, vorwiegend des linken Ventrikels, verbunden mit einer verminderten Kontraktionskraft. Hinzu kommen noch Zeichen einer progressiven Herzinsuffizienz. Histologisch sind hypertrophierte Myozyten und eine Verminderung der Myofibrillen zu erkennen. Außerdem finden sich interstitielle Fibrosen, degenerierte Mitochondrien und Myelinfiguren.

Die DCM ist die häufigste primäre Kardiomyopathie mit einer Inzidenz von 1:100000 Einwohner/Jahr. Besonders Männer im mittleren Alter sind betroffen (m:w = 3:1). Klinisch kommt es zu allgemeinem Unwohlsein, Dyspnoe, Schmerzen im Brustraum, progressiver Herzinsuffizienz und Leistungsabfall. Je schlechter die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels ist, desto schlechter ist die Prognose. Die 10-Jahresüberlebensrate liegt bei ca. 10 -20% bei einer Sterberate von knapp 10%.

Neben Verlaufsbeobachtungen an Patienten mit histologisch nachgewiesener Myokarditis, die das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie entwickelten, gibt es umgekehrt Berichte über Patienten mit der klinischen Diagnose einer DCM, bei denen anhand immunhistologischer Untersuchungen eine Myokarditis diagnostiziert wurde. So haben histologische Befunde an Herzmuskelbiopsien gezeigt, daß bei Patienten mit DCM überdurchschnittlich häufig mononukleäre Zellinfiltrationen und Myozytennekrosen nachweisbar sind. Außerdem finden sich häufig schwere interstitielle Nekrosen als Hinweise auf abgelaufene Myokarditiden (22).

Eine sehr viel qualifiziertere Auswertung der Myokardbiopsien ermöglichen uns die immunhistologischen Verwendung von mononukleären Antikörpern gegen Lymphozytenoberflächenantigene (CD2, CD3, CD4, CD8), Makrophagen und HLA-KlasseI und KlasseII-Antigene. Bei einem Vergleich der histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung von Biopsien von Myokarditispatienten zeigte sich, daß bei ca. 12% der Patienten histologisch, jedoch bei ca. 42% immunhistologisch entzündliche Infiltrationen nachgewiesen werden konnten. Bei 5% der Patienten ergaben sich nach histologischen Untersuchungen Hinweise auf eine Myokarditis, während die Immunhistologie bei 37% einen positiven Befund erbrachte (14, 21, 22).

Zusätzlich weisen beide Krankheitsbilder zahlreiche immunologische Gemeinsamkeiten auf. Dazu gehören erhöhte Autoantikörpertiter gegen verschiedene kardiale Autoantigene, wie z.B. den ANT, den Calciumkanal und das Connexon. Daneben findet man bei beiden Krankheitsbildern virale RNA im Myokard (22).

Diejenigen Patienten, bei denen eine schwere Infektion des Myokards zu einem erheblichen Zelluntergang führt, entwickeln einen myokardialen Restschaden, der als „postmyokarditische Herzerkrankung“ anzusehen ist. Diese entspricht histologisch dem Bild der DCM.

1.4 Der Adeninnukleotidtranslokator und seine Rolle im Krankheitsbild der viralen Herzerkrankung

Das Mitochondrium ist in der aeroben Eukaryontenzelle die Stätte der Energieproduktion, während im Cytosol primär die energieverbrauchenden Prozesse lokalisiert sind. Diese beiden Zellkompartimente sind durch die innere und äußere Mitochondrienmembran räumlich voneinander getrennt. Der Adeninnukleotidtranslokator (ANT) nimmt hinsichtlich der Impermeabilität der inneren Mitochondrienmembran für ADP und ATP eine Schlüsselstellung im Energiestoffwechsel der Zelle ein.

Beim ANT handelt es sich um das am häufigsten im Mitochondrium exprimierte Protein. Es besitzt einen Anteil von 14% am mitochondrialen Gesamtprotein des Myokards und katalysiert den Transport von ADP aus dem Cytosol ins Mitochondrium und von ATP aus dem Mitochondrium ins Cytosol. Somit verbindet er die beiden Zellkompartimente der ATP-Produktion und des ATP-Verbrauches (2). Der Transport ist für diese beiden Substanzen hochspezifisch (1, 3). Er ist unter physiologischen Bedingungen gerichtet und findet als Gegen Austausch im Verhältnis 1:1 statt. Membranpotential, Wasserstoffionenkonzentration, Temperatur und das Verhältnis der Adeninnukleotide regulieren die Transportaktivität des Carriers (37).

Die Transportfunktion des ANT wird durch eine Konformationsänderung ermöglicht. Bei der c-Konformation (c = Cytosol) ist das dreifach positiv geladene Substratbindungszentrum bei ADP-Bindung zur Cytosolseite geöffnet. Durch Konformationsänderung in die m-Konformation (m = Matrix) wird das Bindungszentrum zur Matrix hin geöffnet, der Komplex entläßt ADP und bindet ATP. Die beiden Konformationszustände werden durch zwei ANT-spezifische Inhibitoren fixiert. Hierbei handelt es sich um Carboxyatractylat (CAT), ein Pflanzenglykosid, und um Bongkrekat (BKA), ein von *Pseudomonas cocovenes* produziertes Antibiotikum. CAT, das nicht durch die innere Mitochondrienmembran diffundieren kann, bindet nur auf der cytosolischen, BKA hingegen nur auf der dem Matrixraum zugewandten Seite des ANT's (1, 3, 6). Während des Transports von Adeninnukleotiden findet ein Wechsel von der c- in die m-, bzw. von der m- in die c-Konformation statt. In Gegenwart der spezifischen Inhibitoren ist der ADP/ATP-Austausch gehemmt (3).

In vielen Fällen transportieren Carrier Moleküle aktiv gegen ihren elektrochemischen Gradienten, ein Vorgang, der den Einsatz von Energie verlangt. Für die meisten Metaboliten stammt diese Energie aus dem Co-Transport eines anderen Moleküls, das entsprechend seines elektrochemischen Gradienten verlagert wird. Für das ADP/ATP-Antiportsystem liefert das Membranpotential von etwa 160 mV die treibende Kraft. Dies wird durch den an den Elektronenfluß der Atmungskette gekoppelten Protonentransport aufgebaut (4). Aufgrund des dreifach positiv geladenen Bindungszentrum des Carriers entsteht bei Bindung eines vierfach negativ geladenen ATP's ein negativ geladener Carrier-Substrat-Komplex, während sich die Bindung eines dreifach negativ geladenen ADP-Moleküls an das Zentrum elektrisch neutral verhält. Somit übt die stärker positiv geladene Membranseite im intermitochondrialen Raum eine „Sogwirkung“ aus. Daraus resultiert der gerichtete Transport von ATP ins Cytosol. Die Nettotransportrate des ANT für ATP wird durch das Phosphorylierungspotential des Cytosols und des Mitochondriums kontrolliert. Dabei interessiert primär die cytosolisch/mitochondriale Potentialdifferenz, denn sie gibt den Energiegradienten des ATP über der inneren mitochondrialen Membran an:

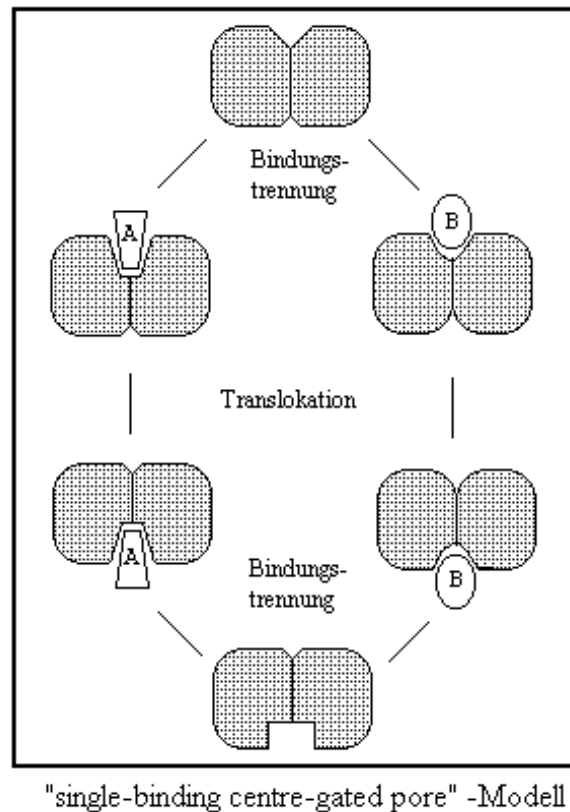
ATP(cyt) x ADP(mit) x Phosphat (mit)

ATP(mit) x ADP(cyt) x Phosphat (cyt)

Der Wert dieses Quotienten spricht sehr sensibel auf Änderungen der Carrieraktivität an. Hieraus ergibt sich, daß beispielsweise eine Reduzierung der Transportrate - über eine Abnahme von ATP(cyt) und ADP(mit) bei gleichzeitiger Zunahme von ADP(cyt) und ATP(mit) - den Wert dieses Quotienten senkt (36).

Der ATP/ADP-Transport verläuft nach dem „single site gated pore mechanism“. Auf beiden Seiten des ANT's liegt eine Substratbindungsstelle. Der Transportweg wird durch die beiden Monomere geformt. Der Mechanismus entspricht dem Ping-Pong-Typ. Die Bindung des Substrates löst unverzüglich die Transportreaktion aus, da durch die Konformationsänderung der Kanal geöffnet wird (4,5).

Abb.: 2

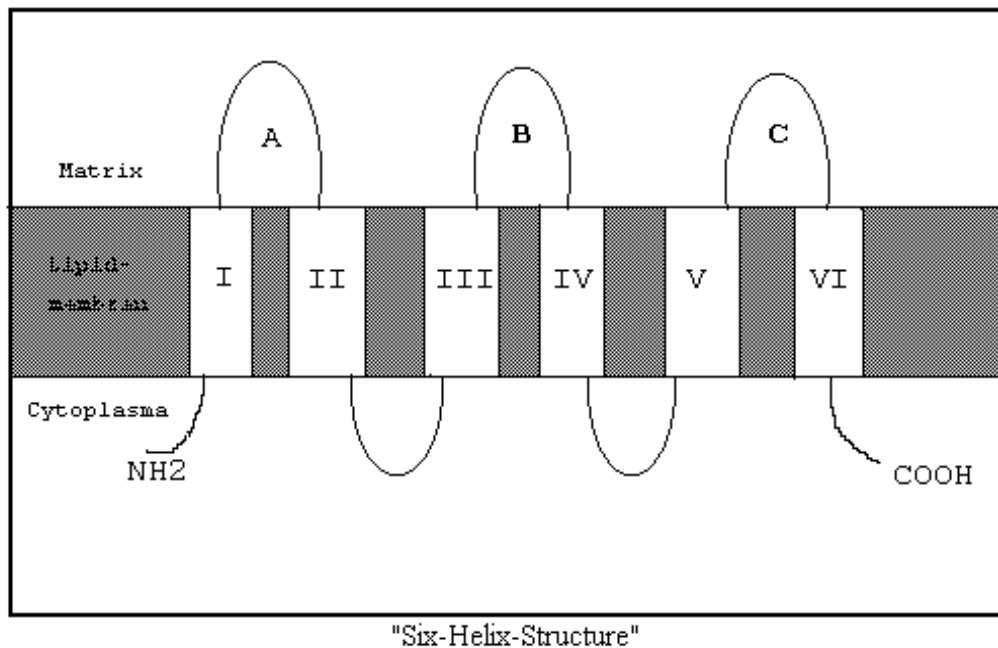


"single-binding centre-gated pore" -Modell

Der Adeninnukleotidtranslokator, gehört zu einer Gruppe von Carrierproteinen, die homologe Aminosäuresequenzen und ähnliche Tertiärstrukturen aufweisen. Hierzu gehören ebenfalls der Oxoglutarat-, der Aspartat-/Glutamat-, der Phosphat- und der Dicarboxylat-Carrier (2). Die metabolische Bedeutung der einzelnen Carrier kann man an deren unterschiedlichen Gewebsverteilung erkennen. Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Produktion von ATP. Da die beiden Hauptcarrier der oxydativen Phosphorylierung der ANT und der Phosphat-Carrier sind, kommen sie auch in allen Mitochondrien und somit in allen Geweben vor (2, 6).

Der ANT besteht aus zwei identischen, 32 kdal schweren Untereinheiten, deren Sequenz von 297 Aminosäuren in drei Bereiche von ungefähr 100 Aminosäuren geteilt werden kann. In jedem Abschnitt existieren zwei hydrophobe Sequenzen von ungefähr 20 Aminosäuren, die innerhalb der Membran liegen. So durchquert jeder Teil zweimal die Mitochondrienmembran („six-transmembrane-helix“). Die hydrophoben helicalen Bereiche werden von hydrophilen - 40-50 Aminosäuren langen - Loops getrennt. So werden polare Bögen gebildet, in denen die Substratbindungsstelle lokalisiert ist. Sowohl das Carboxyl- als auch das Amino-Ende liegt auf der Seite des Cytosols (2, 4, 5, 6).

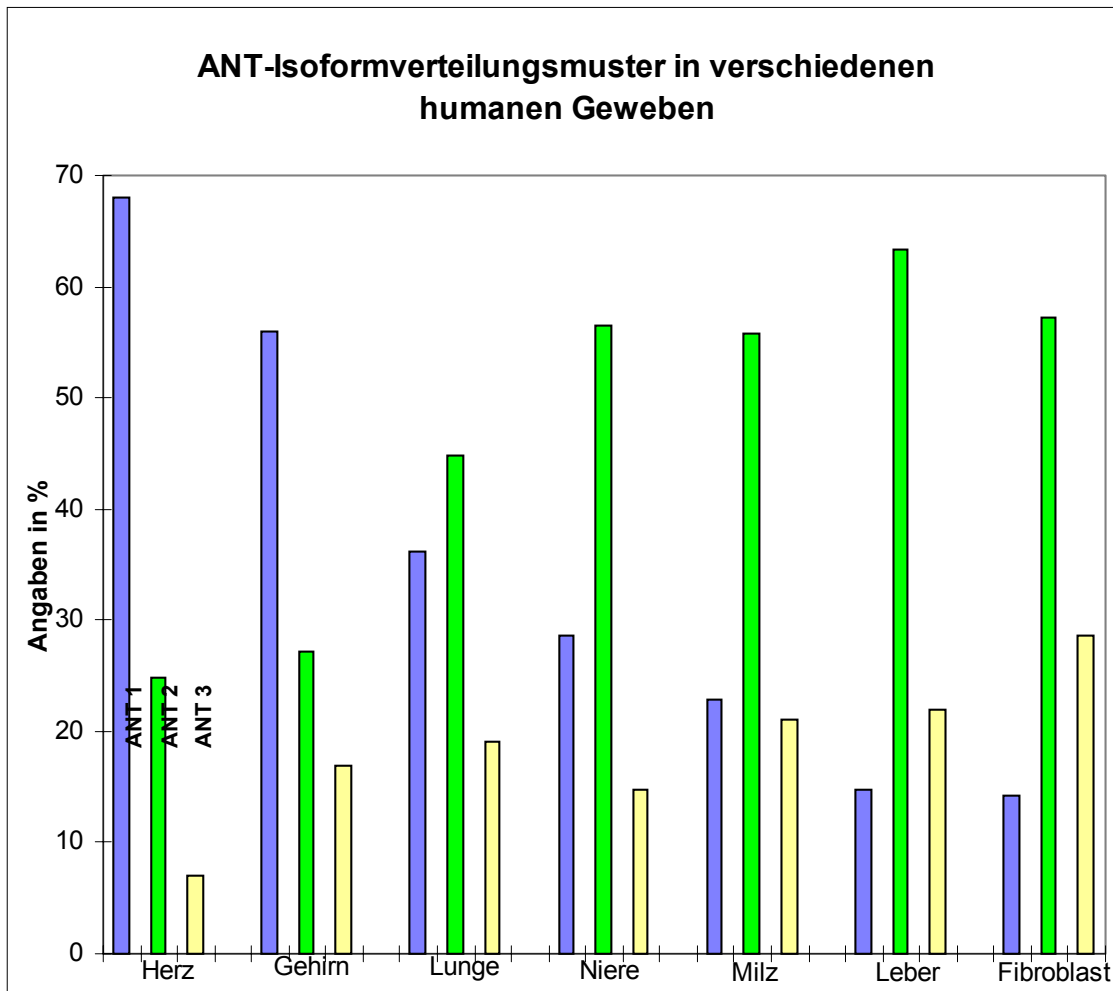
Abb.: 3



Verschiedene antigene Eigenschaften des ANT-Proteins, das aus verschiedenen Geweben isoliert wurde, lassen auf unterschiedliche Isoformen des Carriers schließen (7). Bislang wurden drei verschiedene ADP/ATP-Carrier identifiziert. Die diese Isoformen kodierenden Gene weisen alle einen ähnlichen strukturellen Aufbau auf. Sie besitzen vier gleichlange Exonbereiche und drei Introns von unterschiedlicher Größe. Die Gene sind ungekoppelt und befinden sich auf mindestens zwei verschiedenen Chromosomen. Auf Chromosom 4 liegt das ANT1 kodierende Gen, und auf dem X - Chromosom ist das ANT2 kodierende Gen lokalisiert (7). Die Lokalisation des ANT3 ist das pseudoautosomale Gen des X - Chromosoms (51).

Aus der Literatur ergeben sich Hinweise, daß die drei Isoformen in allen menschlichen Gewebetypen gleichzeitig vorkommen (7, 8, 9, 10). In einer Studie wurde die unterschiedliche gewebsspezifische Isoformverteilung untersucht. Sie führte zu dem Ergebnis, daß ANT 1 primär im Gehirn (55,9 %) und Herzen (68,1 %) exprimiert wird. ANT 2 wird überwiegend in anderen Gewebetypen wie Leber (63,3 %), Lunge (44,8 %), Niere (56,5 %), Milz (55,8 %) und Fibroblast (57,2 %) exprimiert. Im Herzen besitzt er nur einen Anteil von 24,9 % und im Gehirn von 27,1 %. Der ANT 3-Expressionsanteil nimmt in keinem Gewebe eine herausragende Stellung ein, da er überall eine durchschnittliche Beteiligung von 21 % aufweist. Nur im Herzen beträgt er lediglich 7 %. Zusammenfassend kann man sagen, daß ANT1 bes. in wenig generationsfähigem Gewebe (Gehirn , Muskel, Myokard etc.) und ANT2 in noch teilungsfähigem Gewebe vorkommt.

Abb.: 4



In der gleichen Studie wurde das ANT-Expressionsmuster in verschiedenen Herzregionen, wie dem linken Ventrikel, rechtem Ventrikel, den Herzohren und dem Septum ermittelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im myokardialen ANT-Isoformverteilungsmuster beobachtet werden (50).

Sowohl bei Myokarditis- als auch bei DCM-Patienten sind Antikörper gegen den ANT nachweisbar. Sie zeigen sowohl eine Konformations- als auch eine Gewebsspezifität und sind in der Lage, den Adeninnukleotidaustausch in vitro zu hemmen (34, 35).

Tierexperimentelle Untersuchungen an mit myokardialen ANT-Proteinen immunisierten Meerschweinchen haben gezeigt, daß es als Folge einer Immunreaktion gegen den ADP/ATP-Carrier zu einer antikörpervermittelten Funktionsbeeinflussung des Myokards kommt. Werden diese Antikörper experimentell durch Immunisierung mit dem gereinigten Antigen oder aber durch Virusinfektion mit Coxsackie B3 induziert, so führen sie im Myokard der so behandelten Tiere zu einer Störung der Energiebereitstellung und konsekutiv zu einer deutlichen Einschränkung der myokardialen Funktion. Es kam zu einer Verschiebung der Phosphorylierungspotentiale in den einzelnen Kompartimenten (36). Bei den Versuchstieren stieg der ATP-Gehalt im Mitochondrium an, im Cytosol jedoch fiel er ab. Entgegengesetzt verhielten sich die Konzentrationen des ADP's. Da der ANT der einzige für ATP und ADP im Mitochondrium ist, und damit ausschließlich für den Abtransport von ATP aus dem Mitochondrium

verantwortlich ist, lassen diese Daten auf eine beeinträchtigte Funktion des ANT in diesen Tieren schließen. Der Grad der Abnahme der cytosolisch-mitochondrialen Phosphorylierungsdifferenz korrelierte mit der Verschlechterung der Herzarbeit der Tiere.

Darüber hinaus wurde an explantierten Herzen von Patienten mit schwerer dilatativer Kardiomyopathie eine deutlich reduzierte maximale Transportrate für ATP bei gleichzeitig gesteigerter anaerober Stoffwechsellaage beobachtet. Trotz dieser reduzierten maximalen Transportrate für ATP war die Konzentration des ADP/ATP-Carrier-Proteins bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder Kontrollpatienten deutlich erhöht (21,52). Somit kann die erniedrigte Transportrate nicht durch eine erniedrigte Carrierdichte im Mitochondrium erklärt werden. Eine Veränderung bezüglich der ANT - Expression und Funktion konnte im Herzen von Patienten mit Herzvitien, mit toxischer Kardiomyopathie nicht beobachtet werden. Eine Veränderung der myokardialen ANT-Expression war demnach ausschließlich bei Patienten mit MC und DCM nachzuweisen (50). Zudem konnte eine Verschiebung der ANT - Isoformtranskriptionsanteile im Myokard von DCM - und MC - Patienten nachgewiesen werden. Sie war charakterisiert durch eine vermehrte ANT1- und eine verringerte ANT2-Expression. ANT3 bleibt weitestgehend konstant (52).

Tab.: 1

	n	erhöht (n)	(µg/mg Gesamtmembranprotein)
DCM	76	56	79,8 +/- 15,8
V.a. MC	22	13	79,4 +/- 19,6
KHK	18	0	51,7 +/- 3,1
hypertrophe KMP	4	0	52,5 +/- 4,9
Kontrolle	15	0	51,9 +/- 2,7

1

1.5 Problemstellung

Die vorgestellten Daten unterstützen die Hypothese, daß eine Störung im Adeninnukleotid-Transportsystem von entscheidender Bedeutung für die Physiologie der Virusmyokarditis und der dilatativen Kardiomyopathie ist.

Nun stellt sich die Frage, welche Ursache hat die Isoformverschiebung. Anhand klinisch erhobener Daten wird im Folgenden untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der ANT-Expressionänderung und dem hämodynamischen Schweregrad der Erkrankung, der Stärke der myokardialen Entzündung oder einem positiven Virusnachweis besteht.

Entwickeln MC-Patienten mit veränderter ANT-Expression eher einen chronischen Krankheitsverlauf, der zu einer DCM führt, als MC-Patienten mit normler ANT-Verteilung? Auch stellt sich die Frage, ob sich

Patienten mit veränderter ANT-Expression langsamer als solche mit normaler ANT-Verteilung erholen.

Kann die Messung der ANT-Expression einen prognostischen Faktor darstellen?

Welche Bedeutung haben klinische Aspekte wie Hämodynamik, Histologie, Virus und Krankheitsverlauf der MC- und DCM-Patienten und wie stark beeinflussen sie den ANT-Isoformshift? In welchem Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf steht dies?

2 Material und Methoden

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, molekularbiologisch untersuchte ANT-Isoformverschiebungen mit der Klinik von MC- und DCM-Patienten zu vergleichen. All diese Daten stammen aus der Heinrich-Heine - Universität Düsseldorf, hauptsächlich aus der kardiologischen Abteilung oder aus dem Myokarditis-Labor von Herrn Prof. Dr. Schultheiss.

2.1 Herzkatheterismus

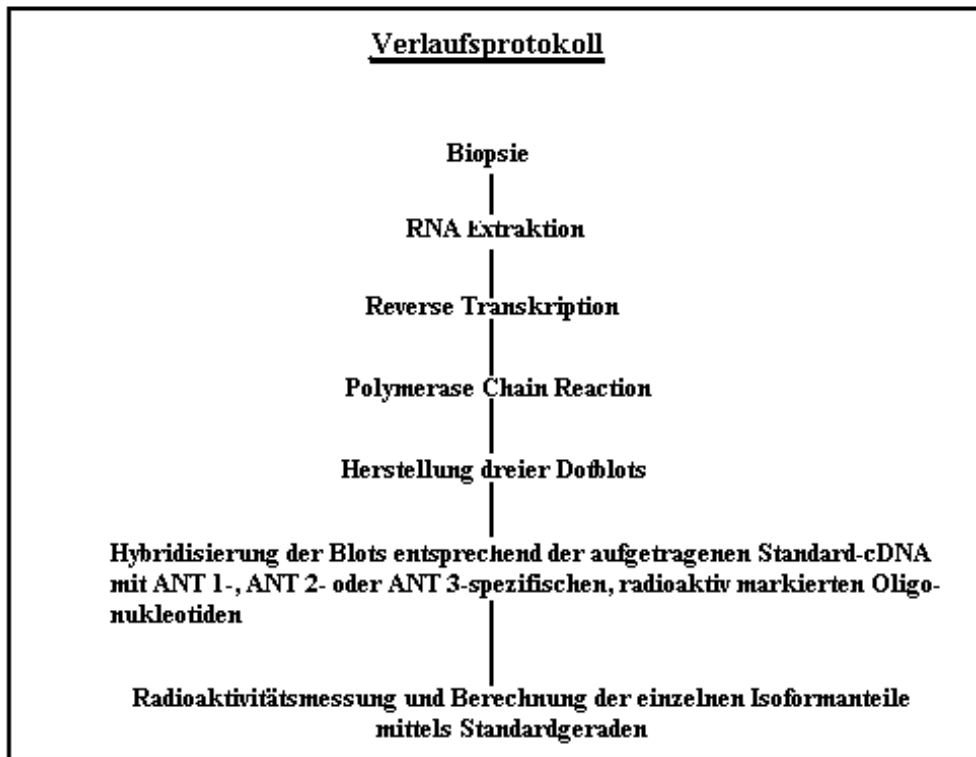
Der Herzkatheterismus ist eine komplexe Untersuchungsmethode zur Abklärung und quantitativen Erfassung von Herzfehlern und der Myokardfunktion. Hierbei können Druck und Durchfluß im großen und kleinen Kreislauf gemessen, Herzmuskeldysfunktionen und Klappeninsuffizienzen bzw. -stenosen bestimmt werden. Zudem kann man durch die Angiokardioographie Aussagen über die Hämodynamik des Herzens (räumlich-zeitliche Darstellung der Herzhöhlen, Bestimmung des enddiastolischen und endsystolischen Kammervolumens und der Ejektionsfraktion) und den Zustand der Koronargefäße treffen(24).

Bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung wird unter Durchleuchtung nach perkutaner Punktion der Vena cubitalis, der Vena subclavia bzw. Vena jugularis interna oder der Vena femoralis ein Katheter mit aufblasbarem Ballon an der Spitze und Thermistorsonde in die rechte Herzkammer und von dort aus in die Arteria pulmonalis vorgeschoben.

Mittels spezieller Biopptome können Gewebeproben aus dem rechten und linken Ventrikel entnommen werden. Die Myokardbiopsie ist wichtig zur histologischen Erkennung einer Myokarditis.

2.2 Molekularbiologie

Abb.: 5



2.2.1 RNA-Extraktion:

Die Gewebeproben (Biopsien), die bei -80°C gelagert wurden, wurden in H-Puffer homogenisiert.

Die Homogenisierung erfolgte mittels eines Polytrons, wobei die extrem hohe Salzkonzentration des H-Puffers sowohl zu einer effektiven Hemmung der endogenen Nukleasen als auch zu einer Deproteinisierung der RNA führte.

Das Homogenat wurde für 24 Stunden bei 4°C gelagert. Nach einer nachfolgenden 1-stündigen Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abpipettiert, und das Pellet durch Zugabe von W-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das auf diese Weise erhaltene Pellet wurde in SP-SDS gelöst und durch Zugabe von Phenol-Chloroform extrahiert, wobei die RNA von den Proteinen getrennt wurde. Nach einer Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die obere wäßrige Phase abpipettiert und weiterverwendet. Eine alkoholische Fällung erfolgte durch Zugabe von eiskaltem 98%igem Ethanol und 3M NA-Acetat pH 5,5 bei -80°C. Hiernach wird nochmals zentrifugiert.

Nach Entfernung des Alkohols wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet, um alle Spuren des Ethanols zu beseitigen. Das völlig getrocknete Pellet wurde in 10µl autoklaviertem Wasser aufgenommen. Die so erhaltene RNA wurde nun bei 260 nm photometrisch vermessen, und der RNA-Gehalt nach unten stehender Formel berechnet. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

OD 260 X 40 X Verdünnungsfaktor

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{OD 260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

2.2.2 Reverse Transkription (RT)

Um spezifische Sequenzen mittels PCR zu amplifizieren, muß die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden, da es sich bei der Taq-Polymerase um eine DNA-Polymerase handelt.

Zum Ablauf der Reaktion wurden ca 150ng RNA eingesetzt, die sich in autoklaviertem Wasser befand. Die RNA wurde bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen aufzuheben und so die RNA für die Reverse Transkriptase zugänglich zu machen.

Nun wird RT-Mix zu der denaturierten RNA gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 37°C inkubiert und jene auf diese Weise fertiggestellte cDNA konnte nun bei -20°C gelagert werden.

2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR): Amplifizierung aller ANT-Sequenzen

Mit Hilfe der PCR kann die Gesamt-ANT gezielt amplifiziert werden. Zur Erkennung der Sequenzen werden komplementäre Primer eingesetzt. Die Primer (s. Tab. 2, Anhang) wurden so gewählt, daß sie komplementär zu homologen Sequenzen in allen ANT-Isoform-cDNAs sind.

Zu dem PCR-Mix wurde cDNA aus dem Ansatz der RT gegeben. Dieser Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, womit gewährleistet war, daß die Verdunstung der Probe im Eppendorfgefäß unterblieb. Die PCR liefert ein PCR-Produkt bestehend aus einem Gemisch von allen ANT-isoform-spezifischen Sequenzen, die identische Anfangs- und Endsequenzen aber ANT-isoform-spezifische Zwischensequenzen liefern.

2.2.3.1 Ablauf der PCR im Trioblock

Die Denaturierungstemperatur betrug 94°C, die Annealingtemperatur 57°C und die Arbeitstemperatur des Enzyms 72°C.

Nach Ablauf der PCR konnte man das PCR-Produkt sorgfältig unter der Ölschicht hervorpipettieren und bei -20°C lagern.

2.2.4 Dot-Blot

Mittels dieses Verfahrens ist es möglich, die relativen Anteile der einzelnen isoformspezifischen des PCR-Produktes zu bestimmen.

Zunächst wurden drei Nylonmembranen (Amersham) vorbereitet. Um die PCR-Proben und die ANT-spezifischen Standardlösungen zu denaturieren, wurden die Proben mit dem gleichvolumigen Zusatz von 0,5 M NaOH, 1M NaCl versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur.

Auf jede der drei Membranen wurden eine jede denaturierte PCR-Probe und eine Verdünnungsreihe von 8, 16, 24, 32 und 40 fmol der ANT1-, ANT2- bzw. ANT3-spezifischen Standard-cDNA, bei denen es sich um ANT-spezifische PCR-Produkte handelt, aufpipettiert. Drei Kästchen blieben für die Nullwertbestimmung frei. Anschließend wurden die Membranen luftgetrocknet und bis zur Hybridisierung in Filterpapier verpackt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5 Radioaktive 5' Markierung von Oligonukleotiden mit Hilfe der T4 Kinase

Die typenspezifischen Oligonukleotide (s. 8.11.3) werden an ihrem 5'Ende mit radioaktivem Phosphat markiert, indem man einen Reaktionsmix hinzugibt (s. 8.10).

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert.

Zur gelchromatischen Trennung der markierten Oligonukleotide von dem freien Gamma-P³²ATP wurden die Proben über sogenannte Nuc-Traps, kleine Säulen, aufgereinigt. Zunächst wurden die Säulen mit STE-Puffer aktiert. Dann erfolgte der Auftrag der Probe. Anschließend wurden die Oligonukleotide durch Eluieren mit STE-Puffer von der Säule gewaschen.

2.2.5.1 Hybridisierung der Dot-Blots mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Vor der eigentlichen Hybridisierung der Membranen mit den entsprechenden Oligonukleotiden muß gewährleistet sein, daß freie Bindungsstellen auf der Membran, an die die Oligonukleotide unspezifisch binden könnten, abgesättigt werden. Diese sogenannte Prehybridisierung erfolgte bei 37°C im rotierenden Hybridisierungssofen. Nach der Zugabe von radioaktiv markierten Oligonukleotiden verlief die Hybridisierung bei 37°C über Nacht.

Anschließend wurden die Membranen mit 6 x SSCP/0,1 SDS; 3M Tetramethylammoniumchlorid und =,1% Triton x-100 gewaschen. Die kritische Waschttemperatur betrug 63°C. Danach wurden die Membranen luftgetrocknet, die einzelnen Dots ausgeschnitten, und die gebundene Radioaktivität in einem β -Counter bei einer Einstellung für ³H gemessen.

In einem Koordinatensystem wurde die gemessene Radioaktivität der Standard-cDNA gegen ihre eingesetzte Molmenge aufgetragen und die Steigung der Geraden berechnet. Durch Vergleich der gebundenen Radioaktivität der PCR-Proben mit der jeweiligen Standardgeraden konnte die entsprechende Molmenge der einzelnen Isoformen bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

2.3 Immunhistologie

Für die immunhistologischen Anfärbungen wurden drei bis vier Biopsien pro Patient unmittelbar nach ihrer Entnahme bei -80°C eingefroren und in Tissue-Tek-Blöcke eingebettet. Von allen Biopsien wurden 5µm dicke Serienschnitte angefertigt und pro Antikörper acht bis zehn Schnitte (zehn bis 15 Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung) ausgewertet.

2.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung

1. Lymphozytenfärbung: Es wurden pro verwendeten Antikörper mindestens zehn Gesichtsfelder (GF) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Die Festlegung der Grenzwerte (Zellen pro GF) erfolgte durch Vergleich mit Kontrollbiopsien, die keine entzündlichen Veränderungen erwarten ließen: hypertroph-nicht-obstruktive Kardiomyopathie (HNCM), arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankung (KHK), Muskelgewebe von Patienten nach Herzklappenoperationen. In keiner Kontrollgruppe wurden mehr als 0,3 bis 0,5 Lymphozyten/GF (0,9 bis 1,5 Zellen/mm³) beobachtet (Durchschnitt aus 10 GF). Eine Biopsie wurde als positiv bewertet, wenn mehr als 2,0 Lymphozyten/GF (ausgeprägte zelluläre Infiltration) oder mehrere fokale Lymphozytenzellnester mit überwiegend aktivierten Zellen sowie zusätzlich aktivierte Makrophagen nachgewiesen werden konnten.

2.HLA-Antigenexpression: Zusätzlich zum Lymphozytennachweis wurde in den Biopsien die HLA-Antigenexpression mit Hilfe der Immunperoxidasetechnik semiquantitativ untersucht. Die semiquantitative Bewertung einer verstärkten HLA-Antigenexpression erfolgte entsprechend ihrem optischen Färbeverhalten. Begutachtet wurde die Anfärbung auf interstitiellen Zellen sowie auf dem Endothel von Arterien, Arteriolen und Venen.

Die Klassifizierung erfolgte nach folgender Einteilung:

0-1+: Keine oder schwache Anfärbung von Zellen und Gefäßendothel für HLA-I entsprechendem normalen Myokardgewebe: HLA-II ist nur in Spuren nachweisbar.

2+: Schwache und teilweise fokal verstärkte Anfärbung von HLA-I und II auf zahlenmäßig vermehrten interstitiellen Zellen und dem Gefäßendothel.

3+: Das Gefäßendothel von Venen und Arterien ist deutlich verbreitert angefärbt; ebenso ist die Farbreaktion auf den deutlich vermehrt vorkommenden interstitiellen Zellen stark erhöht.

2.3.2 Verwendete Antikörper

Der Nachweis der lymphozytären Infiltrate erfolgte mit monoklonalen Maus-anti-human-Antikörpern gegen die Lymphozytenoberflächenantigene CD2, CD3, CD4 und CD8, den Pan-T-Marker T200 (CD45R) gegen aktivierte Makrophagen (MA 102) sowie gegen Histoinkompatibilitätsantigene (HLA-1 und HLA-DR). Der Nachweis aktivierter Lymphozyten erfolgte mit dem Antikörper gegen CD45RO (UCHL-1). Als zweiter Antikörper wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin -Peroxidase-markiert- 1:200 verdünnt verwendet.

2.3.3 Immunperoxidasefärbung

Die einzelnen Schnitte wurden mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) vorinkubiert, um spezifische Immunglobulinbindungen zu blockieren. Daraufhin erfolgte eine 45minütige Inkubation mit dem

monoklonalen Mausantikörper in vorgetesteten Verdünnungen. Die gebundenen Antikörper wurden mit Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Immunglobulin nachgewiesen. Die Anfärbung erfolgte mit 3-Amino-Ethylcarbazol, als Gegenfärbung wurde Mayers Hämalaunlösung verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden in Kaisers Glycingelatine eingebettet.

2.4 Nachweis enteroviraler RNA im Myokardgewebe

Zum Virusnachweis wurde RNA aus den Untersuchungsproben isoliert und anschließend revers transkribiert. Mit Hilfe der PCR konnten vorhandene enterovirale cDNA mittels eines Primerpaares (s. Tab. 4, Anhang) amplifiziert werden. Das entstandene PCR-Produkt hatte 315 bp. Die Amplifizierung eines β -Actin-spezifischen PCR-Produktes von 461 bp durch ein weiteres Primerpaar diente als interne Positivkontrolle.

Zur viralen Positivkontrolle diente ein Plasmid (pCVB3-R1) mit inserierter 7.2 kp langer CVB3 (Coxsackie B3) cDNA. Das Plasmid wurde von Herrn Prof. Dr. R. Kandolf, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, und seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Folgender Reaktionsansatz für die Plasmid-PCR lag vor: 100 pg mit Bam HI geschnittenes Plasmid, 1 x PCR-Puffer, je 0,4 μ M der beiden Primer, je 1 mM dNTPs und 0,25 Units Taq-Polymerase in einem Endvolumen von 50 μ l Aliquots der PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nylonmembranen transferiert. Hiernach erfolgte die Hybridisierung mit radioaktiven, virusspezifischen Oligonukleotiden (s. 8.11.3 und 8.11.4).

2.5 Statistische Methoden

1) Beschreibende Statistik: Umfangreiche Daten verschiedener Untersuchungen werden geordnet, zusammengefaßt und übersichtlich dargestellt. Hierbei wird eingegangen auf das Maß zur Charakterisierung eines "Durchschnitts" (arithmetischer Mittelwert), auf die Maße zur Kennzeichnung der Streuung (Varianz, Standardabweichung) und die Möglichkeiten der graphischen Darstellung (29).

$$\text{Mittelwert} = \frac{\text{Summe aller } x\text{-Werte}}{\text{Anzahl aller Werte}}$$

$$\text{Varianz} = \frac{\text{Summe aller Abweichungsquadrate}}{\text{Zahl aller Meßwerte} - 1}$$

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\text{Varianz}}$$

2) Regression und Korrelation: Hierbei handelt es sich um Methoden, um die Abhängigkeit zwischen zwei Merkmalen zu beschreiben und um bei Kenntniss eines Wertes Vorraussagen über den anderen Wert zu machen. Die Regressionsgerade beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen den x- und y-Werten.

Unter den vielen möglichen Geraden, die man durch eine Punktwolke legen kann, ist sie bei der Schätzung der x-Werte aus den y-Werten die Günstigste.

Der Korrelationskoeffizient gibt an, wie stark die Punktwolke um die Regressionsgerade streut. Die Streuung ist umso größer, je geringer der Betrag des Korrelationskoeffizienten (r) ist. Ein positives Vorzeichen bedeutet, daß eine Zunahme von x mit einer Zunahme von y verbunden ist (positive Korrelation). Ein negatives Vorzeichen bedeutet, daß mit einer Zunahme von x eine Abnahme von y verbunden ist. Der Korrelationskoeffizient kann alle Werte zwischen $+1$ und -1 annehmen. Bei $r = +1$ oder $r = -1$ liegen alle Punkte auf einer Geraden (29).

Regressionsgerade: $y = b_{yx} + a_{yx}$

Steigung (b_{yx}): $b_{yx} = \frac{\text{Summe der Produkte}}{\text{Summe der Quadrate}}$

y-Achsenabschnitt (a_{yx}): $a_{yx} = \bar{y} - b_{yx} \bar{x}$

Korrelationskoeffizient: $r = \frac{\text{Summe der Produkte}}{\sqrt{\text{Summe der Quadrate } x \cdot \text{Summe der Quadrate } y}}$

3) Statistische Testverfahren: Mit statistischen Testverfahren kann man prüfen, ob erhobene Daten für eine Hypothese sprechen oder ob sich die Daten auch durch zufallsbedingte Abweichungen erklären lassen.

Der t-Test dient zum Vergleich der Mittelwerte zweier normalverteilter Stichproben. Hierbei wird eine Nullhypothese aufgestellt, welche besagt, daß die Mittelwerte nicht voneinander abweichen. Eine Alternativhypothese hingegen besagt, daß sie voneinander abweichen. Der berechnete Wert t wird mit einem Quantil, in welches die Anzahl der Freiheitsgrade und die Irrtumswahrscheinlichkeit (z.B.5%) einfließt, verglichen. Die Nullhypothese gilt, wenn das Quantil größer ist als t , die Alternativhypothese gilt im umgekehrten Fall (29).

$t = \frac{d}{s_d} = \frac{\text{Differenz der Mittelwerte}}{\text{mittlerer Fehler der durchschnittlichen Differenz}}$

$s_d = s \cdot \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$

Freiheitsgrade $f = n_1 + n_2 - 2$

Gilt nur bei Normalverteilung und bei gleicher Varianz der beiden Gruppen, ansonsten nimmt man den u - Test.

4) χ^2 -Test : Hierbei handelt es sich um ein Testverfahren, für den Vergleich von Häufigkeitsunterschieden zweier alternativer Merkmale. Ausgangspunkt bilden im einfachsten Fall zwei qualitative Merkmale mit je zwei Ausprägungen. Die Häufigkeit für das Auftreten der vier Merkmalskombinationen in einer Stichprobe vom Umfang n werden tabellarisch in einer 2x2- oder Vierfeldertafel zusammengefaßt.

5) p-Wert: Hierbei handelt es sich um Signifikanzniveaus von Korrelationen. Für alle Korrelationskoeffizienten lassen sich die Irrtumswahrscheinlichkeiten dafür berechnen, daß die Korrelationskoeffizienten signifikant von Null verschieden sind. Der P-Wert gibt die prozentuale Wahrscheinlichkeit an, daß ein Korrelationskoeffizient signifikant von Null verschieden ist. P-Werte gibt es bei allen Testverfahren. $P \leq 0,05$ bedeutet einen signifikanten Unterschied.

$$T = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \sqrt{n-2}$$

3 Untersuchtes Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ANT-Expression von drei verschiedenen Kollektiven verglichen. Hierbei handelt es sich um die Gruppen der Kontrollpersonen (n = 29), der an Myokarditis Erkrankten (n = 63) und der an dilatativer Kardiomyopathie Erkrankten (n = 40).

3.1 Kontrollkollektiv

Hierbei handelt es sich um Gewebeproben, die Verstorbenen im Rahmen der pathologischen Untersuchung entnommen wurden. Keiner dieser Patienten litt an einer kardialen Erkrankung.

Alle Gewebeproben wurden vor dem 1.5.94 entnommen.

3.2 Patienten mit klinisch starkem V. a. Myokarditis

Zur Untersuchung des ANT-Expressionsmusters, des Nachweises von enteroviraler RNA im Myokard und zur immunhistologischen Aufbereitung standen Herzmuskelbiopsien aus dem rechtsventrikulären Septum zur Verfügung. Diese wurden in der kardiologischen Abteilung der MNR-Klinik von Düsseldorf entnommen. Die Diagnosestellung stützte sich auf die Anamneseerhebung, das EKG, die Elektrokardiographie, die Herzkatheteruntersuchung einschließlich Koronarangiographie und linksventrikulärer Angiographie und den immunhistologischen Befund. Die Diagnose Myokarditis stellte man bei einem immunhistologischen Nachweis von Makrophagen, lymphozytären Infiltraten und/oder erhöhter HLA-Expression. Im Rahmen dieser Studie wurden 63 Patienten untersucht, die erst seit wenigen Monaten an der Erkrankung litten. Andere wiederum wiesen eine Anamnese von etlichen Jahren auf. Die Einteilung erfolgte in eine Krankheitsdauer von höchstens zwei Jahren (n = 35) und von mehr als zwei Jahren (n = 28). Es handelte sich um 20 weibliche und 43 männliche Patienten in unterschiedlichem Alter (Altersdurchschnitt: 49 Jahre). Neun der Patienten waren in der Altersstufe unter 30, 18 gehörten zu der Gruppe der 31-50-jährigen, 34 Leute befanden sich im Alter von 51-70 Jahren und zwei Patienten waren älter als 71 Jahre.

Zehn der 63 Patienten wurden mehrfach im Abstand einiger Monate biopsiert, um den Krankheitsverlauf und die Veränderung der Immunhistologie zu beurteilen.

3.3 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

Auch hierfür wurden Herzmuskelbiopsien des rechtsventrikulären Septums verwendet. Eine dilatative Kardiomyopathie wurde, entsprechend der Definition der WHO/ISFC task force, anhand folgender Kriterien diagnostiziert:

- Vorliegen einer chronischen Herzmuskelerkrankung unbekannter Ätiologie und ohne Assoziation mit anderen Erkrankungen
- Fälle einer spezifischen Herzerkrankung wurden ausgeschlossen

- negative histologische und immunhistologische Biopsiefunde
- echokardiographisch nachgewiesene Dilatation der linken Herzkammer

Es wurden 40 Patienten untersucht, darunter waren 10 Frauen und 30 Männer. Insgesamt gesehen lag das Durchschnittsalter (ca. 53 Jahre) in diesem Patientenkollektiv etwas höher. Nur zwei Personen waren unter 30 Jahre, 11 gehörten zur Gruppe der 31-50-jährigen, 26 waren 51-70 Jahre alt und eine Patientin war älter als 70.

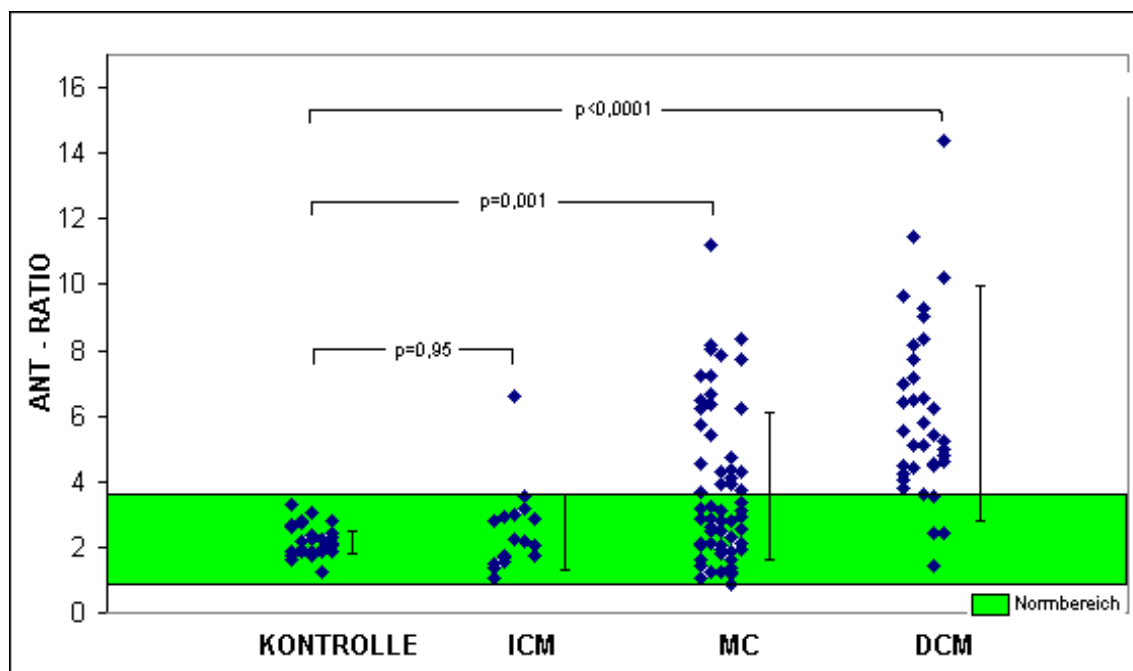
4 Ergebnisse

4.1 Normalbereiche für die einzelnen ANT-Isoformexpressionsanteile im Myokard

Drei ANT-Isoformen werden in gewebespezifischen Mustern exprimiert. Zur Beschreibung der normalen kardialen ANT-Isoform Transkription wurden die ANT-Isoform mRNA-Anteile in Herzmuskelgewebe von 29 Personen, die an keiner kardialen Erkrankung verstorben waren, bestimmt. Der ANT1-mRNA-Anteil betrug im Herzen dieser Patienten durchschnittlich 68,1 +/- 4,5%, ANT2 24,9 +/- 5,1% und ANT3 7,0 +/- 2,1%. Zur Vereinfachung der weiteren Datenpräsentation wurde das Verhältnis von ANT1 / (ANT2 + ANT3) mRNA berechnet. In der Gruppe der Kontrollpersonen betrug die ANT-ratio 2,19 +/- 0,46. Werte, die außerhalb des Bereiches: Mittelwert +/- 3fache Standardabweichung dieses Kontrollwertes lagen, wurden als pathologisch bezeichnet.

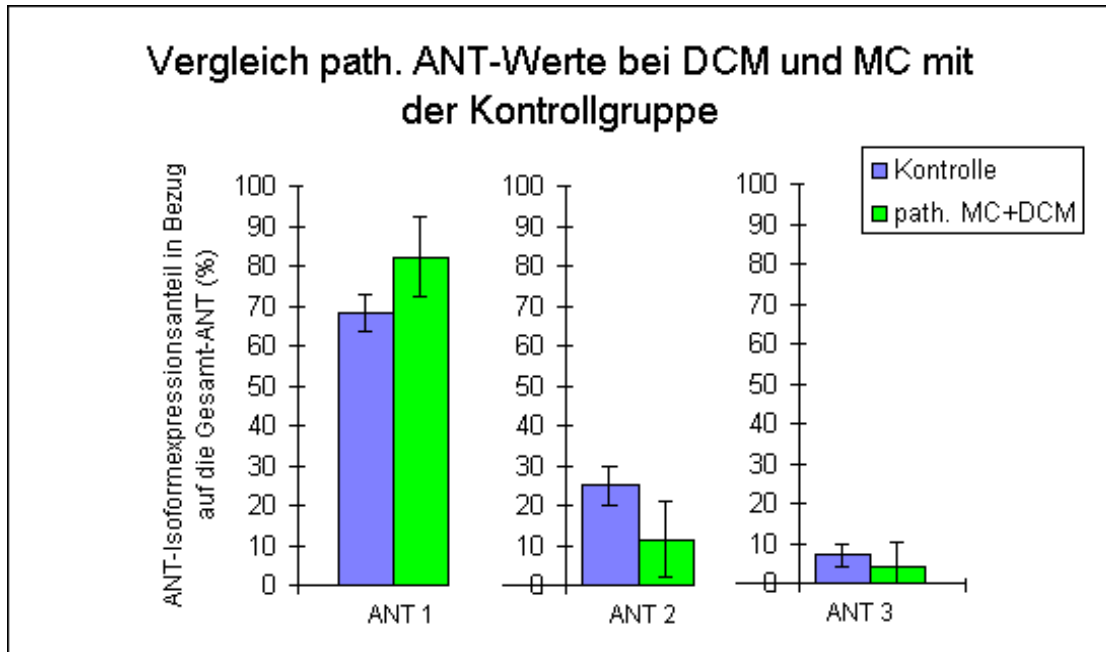
Im Folgenden wurde das ANT-Isoformtranskriptionsmuster in explantiertem Herzgewebe von 17 Patienten, die aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie transplantiert wurden, bestimmt. In diesem Kollektiv zeigte nur ein Patient eine veränderte ANT-Isoform-Transkription, die von einer erhöhten ANT-ratio gekennzeichnet war.

Abb.: 6 ANT-ratio im Vergleich Kontrollgruppe / ICM / MC und DCM



Das ANT1 / (ANT2 + ANT3) mRNA-Verhältnis war im Kollektiv der Patienten mit entzündlicher Herzerkrankung (3,745 +/- 2,279, p = 0,001) und dilatativer Kardiomyopathie (6,616 +/- 3,866, p < 0,0001) signifikant erhöht. 24 der 62 Patienten mit einer kardialen Entzündung waren von einer Verschiebung des kardialen ANT-Isoform-Transkriptionsmusters betroffen. In dem Kollektiv der DCM-Patienten zeigten 35 der 40 untersuchten Patienten eine erhöhte ANT-ratio und damit eine veränderte ANT-Isoformtranskription.

Abb.: 7



Die einzelnen ANT-m-RNA-Anteile derjenigen Patienten, die ein erhöhtes ANT1/ (ANT2 + ANT3) -Verhältnis aufzeigten, sind im Vergleich zu den Kontrollwerten in Abb.: 7 dargestellt. Der ANT-Isoformshift ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung des ANT 1-mRNA-Anteiles von 68,1 +/- 4,5% auf 82,1 +/- 10,1% bei einer gleichzeitigen Erniedrigung des ANT 2-Anteiles (24,9 +/- 5,1% zu 11,43 +/- 9,51%) und einem nahezu unveränderten ANT 3-Anteil.

4.2 Zusammenhang hämodynamischer Parameter mit der ANT-Expression

Der klinische Alltag zeigt uns, daß Patienten mit Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie schlechter belastbar sind. Ihre Herzen haben oft eine verminderte hämodynamische Leistungskapazität gegenüber denen gesunder Personen. Bleibt nun die Frage, ob hiermit die Veränderung der ANT-Isoformexpression in Zusammenhang steht. Im Folgenden soll der Zusammenhang zwischen einzelnen hämodynamischen Parametern und der ANT-Expression untersucht werden.

Das Herzkreislaufsystem hat die Aufgabe, den Bedürfnissen entsprechend die Perfusion des Organismus zu gewährleisten. Anhand verschiedener hämodynamischer Parameter kann man die Schwere einer Herzinsuffizienz beschreiben. Der Kontraktilitätszustand des Myokards im intakten Organismus wird durch die basale funktionelle und strukturelle Integrität der einzelnen Myokardeinheiten bestimmt. Patienten mit Myokarditis und besonders mit dilatativer Kardiomyopathie leiden aufgrund der nachlassenden Kontraktionskraft des Herzens an einer Volumenbelastung der Herzkammern.

Der Parameter Herzindex (HI (l/min/m²)) beschreibt das normale Herzminutenvolumen in Bezug auf die Körperoberfläche.

Beim Schlagvolumen handelt es sich um die Blutmenge, die das Herz bei jeder Kontraktion auswirft. Der Schlagvolumenindex (SVI (ml/m²)) beschreibt das Volumen bezogen auf m² Körperoberfläche. Den Anteil

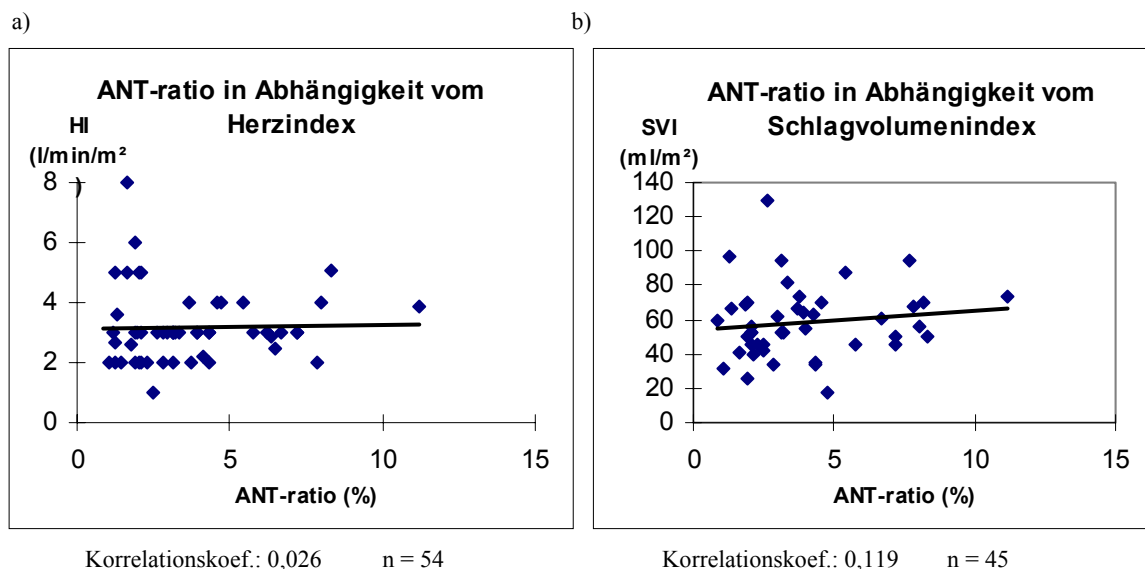
des Schlagvolumens am enddiastolischen Füllungsvolumen bezeichnet man als Ejektionsfraktion (EF (%)). Sie dient als Maß für die Kontraktilität des Herzens und stellt das Verhältnis vom Schlagvolumen zum enddiastolischen Volumen dar.

Über den enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Volumenindex (EDVI und ESVI (ml/m²)) erhält man eine Information über den Grad der Dilatation des linken Ventrikels. Mittels des echokardiographisch ermittelten linksventrikulären Durchmessers (EDD (mm)) während der Diastole können zusätzlich Rückschlüsse über den Grad der Herzkammerdilatation gezogen werden. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP (mmHg)) gibt Auskunft über die Druckerhöhung innerhalb der Herzkammern herzinsuffizienter Patienten.

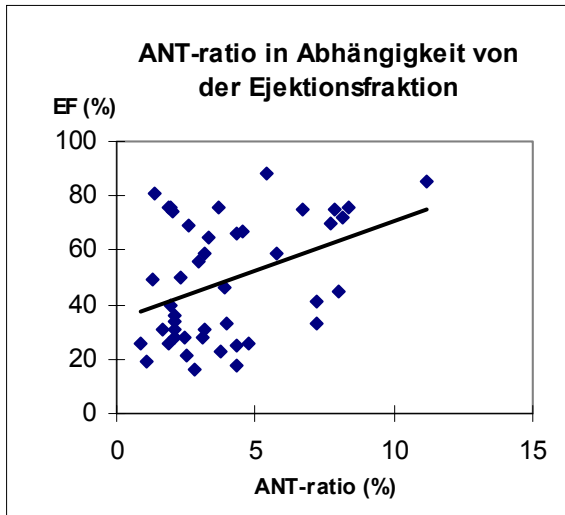
Um eventuelle Zusammenhänge zwischen dem hämodynamischen Schweregrad der Erkrankung und der Verschiebung des ANT-Expressionsmusters aufzudecken, wurden die Korrelationen zwischen dem ANT 1/ (ANT 2 + ANT 3)-m-RNA-Verhältnis und den verschiedenen hämodynamischen Funktionsparametern berechnet.

4.2.1 Patienten mit klinischem V. a. eine Myokarditis

Korreliert wurden die oben genannten hämodynamischen Parameter der an **Myokarditis** erkrankten Patienten mit deren ANT-ratio's (s. 8.3). In den folgenden Abbildungen (a - g) sind die Korrelationen dargestellt. Da leider nicht von allen Patienten vollständige Hämodynamikwerte zur Verfügung standen, wurden nicht immer alle 63 Patienten berücksichtigt. Die jeweilige Anzahl für jeden Wert wurde mit n = ? angegeben.

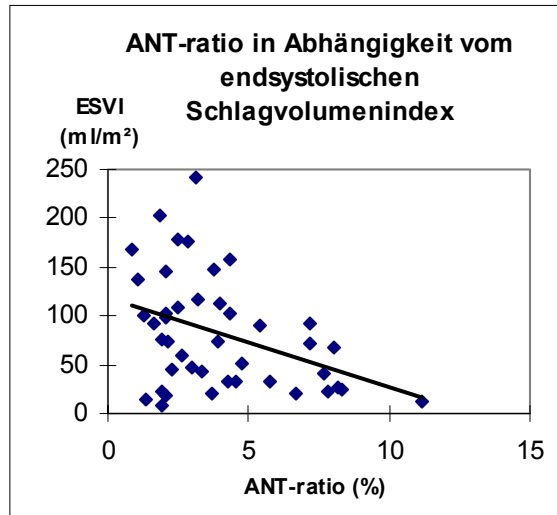


c)



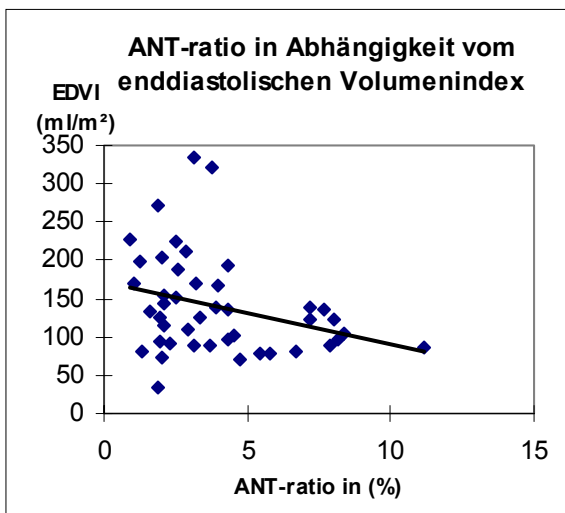
Korrelationskoeff.: 0,395 n = 46

d)



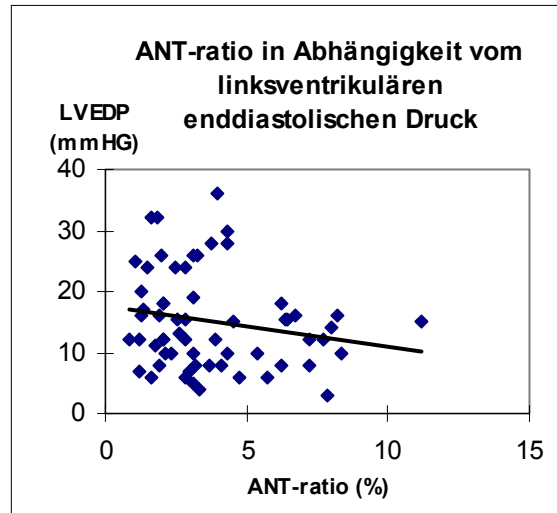
Korrelationskoeff.: -0,389 n = 44

e)



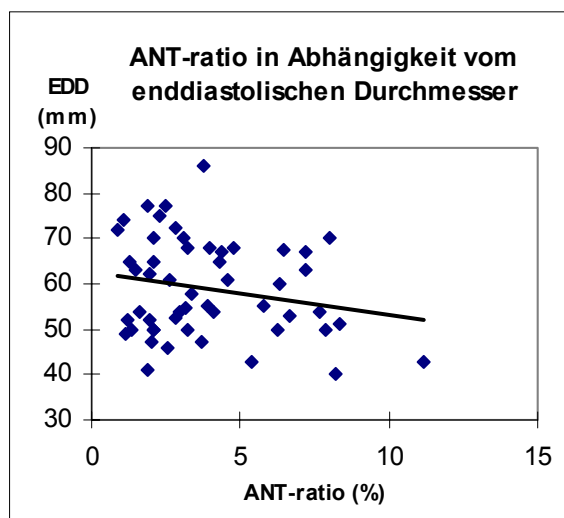
Korrelationskoeff.: -0,306 n = 43

f)



Korrelationskoeff.: -0,189 n = 61

g)



Korrelationskoeff.: - 0,029 n = 60

Abb.:8 Korrelation der hämodynamischen Parameter HI (a), SVI (b), EF (c), ESVI (d), EDVI (e), LVEDP (f) und EDD (g) mit der ANT-ratio bei MC-Patienten

Aus den Korrelationskoeffizienten von 0,026 für HI , 0,119 für SVI, 0,395 für EF, -0,389 für ESVI, -0,306 für EDVI, -0,189 für LVEDP und -0,209 für den Parameter EDD läßt sich schließen, daß kein direkter Zusammenhang zwischen den einzelnen hier aufgeführten Parametern und der ANT-Expression bei einer Herzmuskelentzündung besteht.

Tab.: 2a Hämodynamikparameter von Patienten mit normalem (n) und pathologischem (p) ANT-Isoformmuster (ANT-ratio) bei MC

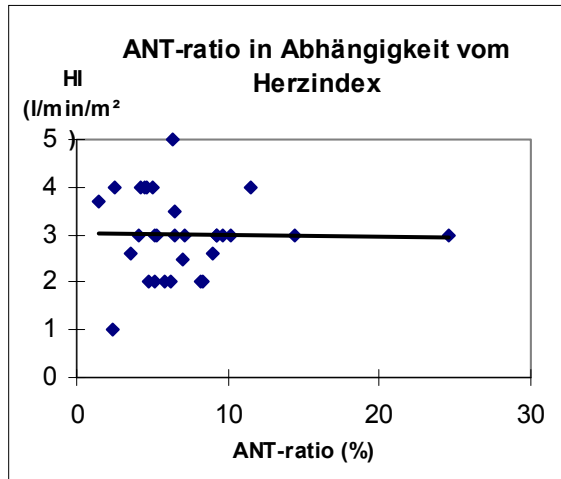
	ANT-ratio n	ANT-ratio p	p-Wert
HI	3,15 +/- 1,44	3,15 +/- 0,78	0,996
SVI	59,1 +/- 23,6	59 +/- 18,2	0,99
EF	44,4 +/- 20,9	54,9 +/- 22,9	0,11
ESVI	102,6 +/- 65,2	61,8 +/- 43,4	0,021
EDVI	159,5 +/- 71,1	122,6 +/- 56,6	0,065
LVEDP	15,5 +/- 7,7	14,4 +/- 8,2	0,59
EDD	59,4 +/- 10,6	58,1 +/- 10,9	0,69

Werden die Patienten bezüglich ihres ANT-Isoform-Transkriptionsmusters gruppiert und die hämodynamischen Parameter dieser beider Gruppen verglichen, so zeigten sich mit Ausnahme des ESVI keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Patienten mit DCM

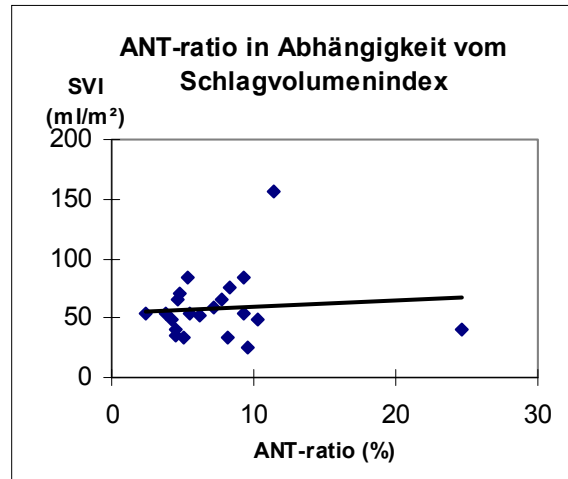
Im Folgenden wurden die hämodynamischen Parameter der **DCM-Patienten** mit den ANT-ratio's (s. 8.4) verglichen. In den folgenden Abbildungen (a-g) sind die Korrelationen dargestellt. Auch hier standen nicht alle Hämodynamikwerte zur Verfügung. Daher wurde von Parameter zu Parameter mit einer unterschiedlichen Patientenzahl gerechnet.

a)



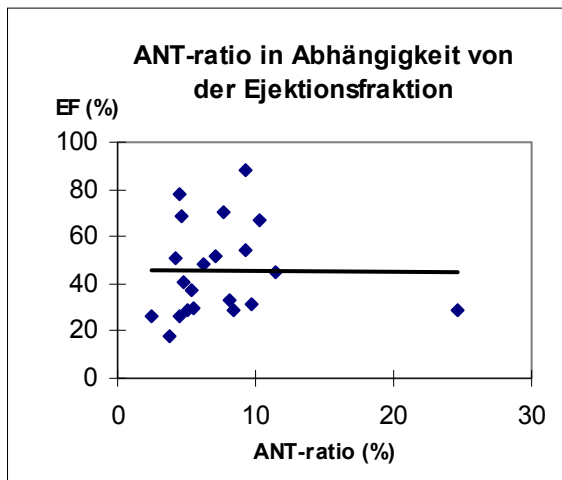
Korrelationskoeff.: -0,017 n = 30

b)



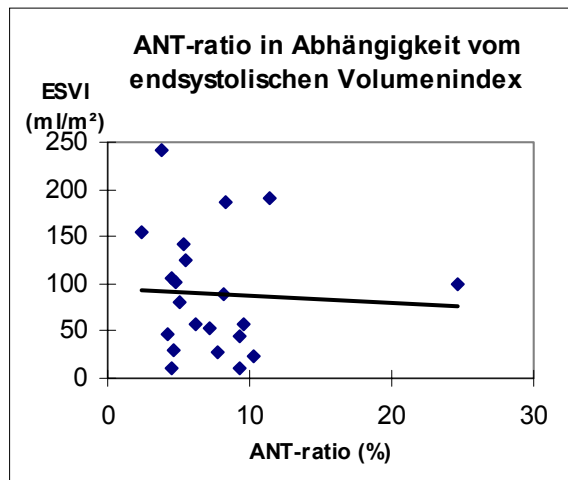
Korrelationskoeff.: 0,081 n = 21

c)



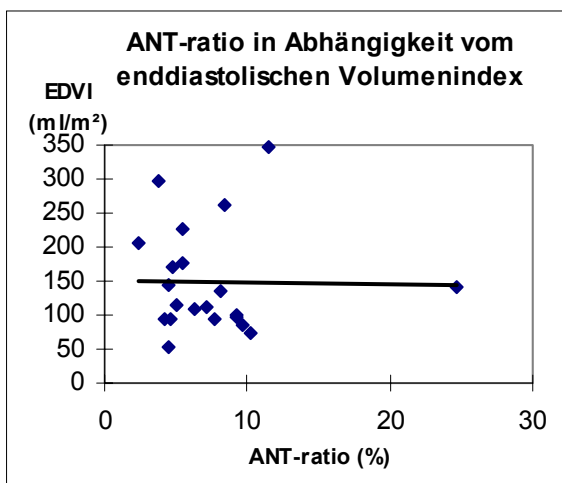
Korrelationskoeff.: -0,006 n = 23

d)



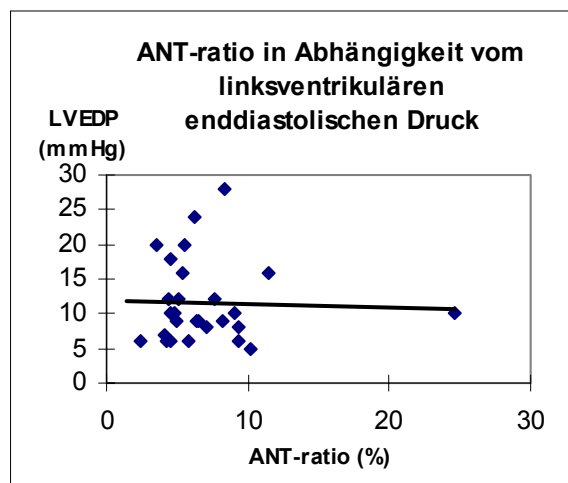
Korrelationskoeff.: -0,058 n = 21

e)



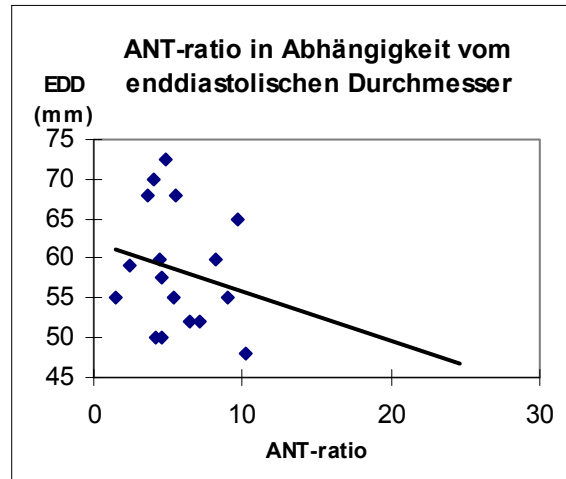
Korrelationskoeff.: -0,02 n = 21

f)



Korrelationskoeff.: -0,032 n = 27

g)



Korrelationskoef.: -0,201 n = 17

Abb.: 9 Korrelation der hämodynamischen Parameter HI (a), SVI (b), EF (c), ESVI (d), EDVI (e), LVEDP (f) und EDD (g) mit der ANT-ratio bei DCM-Patienten

Aus den Korrelationskoeffizienten von -0.017 für HI, 0.081 für SVI, -0.001 für EF, -0.058 für ESVI, -0.02 für EDVI, -0.032 für LVEDP und 0,201 für den Parameter EDD läßt sich schließen, daß ebenfalls kein direkter Zusammenhang zwischen den einzelnen hier aufgeführten Parametern und der ANT-Expression besteht.

Tab.: 2b Hämodynamikparameter von Patienten mit normalem (n) und pathologischem (p) ANT- Isoformmuster (ANT-ratio) bei DCM

	ANT-ratio n	ANT-ratio p	p-Wert
HI	2,9 +/- 1,65	3 +/- 0,78	0,84
SVI	53	58,9 +/- 28,4	0,84
EF	26	43,6 +/- 20,6	0,41
ESVI	154	86,2 +/- 64,2	0,32
EDVI	207	146,2 +/- 79,2	0,46
LVEDP	13 +/- 9,9	11,4 +/- 5,8	0,73
EDD	57 +/- 2,83	59 +/- 8,1	0,74

Wie man sieht, sind die p-Werte bei den DCM-Patienten im Vergleich von Personen mit normaler und verschobener ANT-ratio völlig unsignifikant.

Tab.: 2c Hämodynamikparameter von Patienten mit normalem (n) und pathologischem (p) ANT-Isoformmuster (ANT-ratio) bei MC + DCM

	MC +DCM ANT-ratio n	MC +DCM ANT-ratio p	p-Wert
HI	3,14 +/- 1,4	3,1 +/- 0,8	0,918
SVI	58,9 +/- 22,7	59 +/- 29	0,915
EF	43,8 +/- 20,4	49 +/- 21,7	0,26
ESVI	104 +/- 63,4	74 +/- 54,1	0,17
EDVI	161,3 +/- 69	134,4 +/- 67,3	0,26
LVEDP	15,4 +/- 7,6	12,9 +/- 7,1	0,66
EDD	59,5 +/- 10,1	58,4 +/- 9,5	0,7

Tabelle 2c zeigt zusammengefaßt Hämodynamikdurchschnittswerte der Patienten mit MC bzw. DCM normalem oder verschobenem ANT1/ (ANT2 + ANT3) - Verhältnis. Hier ergaben sich keine deutlichen Unterschiede.

4.3 Bedeutung des Entzündungsgrades für die ANT-Expression

Mittels der Immunhistologie ist es möglich, genaue Aussagen über den Entzündungsgrad einzelner Herzbiopsien zu machen. Der Expressionsgrad verschiedener Oberflächenmarker (CD2, CD3, CD4, CD8, HLA1 und HLA2) wurde hierfür benutzt.

Es gibt mittlerweile eine einheitliche Nomenklatur für Zelloberflächenmarker, das CD-System (cluster-designation), in welchem die Marker fortlaufend als CD1, CD2 usw. numeriert werden (23).

Bei CD2 und CD3 handelt es sich um Marker für alle T-Zellen, CD4 ist ein Marker für T-Helfer-Zellen. Bei CD8 handelt es sich um einen Marker für zytotoxische oder Suppressor-T-Zellen (23, 26). Beim UCHL handelt es sich um einen Marker aktivierter Lymphozyten.

Beim HLA-System (human leucocyte antigen system) handelt es sich um eine Gruppe genetisch determinierter Gewebsantigene des Menschen. Sie werden auch Histoinkompatibilitätsantigene genannt.

Eine verstärkte Expression dieser Oberflächenantigene wird im menschlichen Gewebe nachgewiesen, wenn eine Autoimmunerkrankung, eine Abstoßungsreaktion, ein viraler Befall oder eine andere Entzündung vorliegt (38). Somit kann die Stärke der Expression dieser Oberflächenproteine Hinweise auf ein entzündliches Geschehen in den untersuchten Myokardbiopsien geben (39).

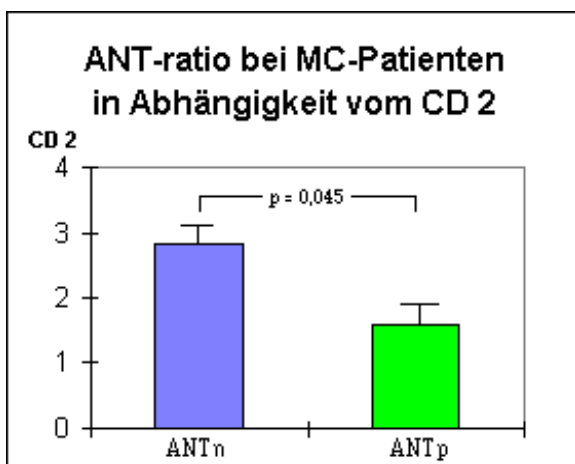
Tab.: 3 Aufschlüsselung der Anzahl der Myokarditispatienten nach ihrer immunhistologischen Beurteilung und ihrer ANT-ratio

Befund	n (gesamt)	ANT-ratio n	ANT ratio p
positiv	47	29	18
negativ	14	7	7
keine Daten vorhanden	1	1	0

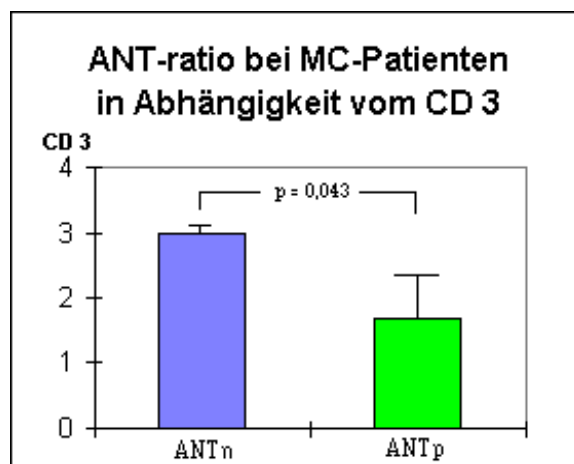
Es kann zwischen positiven und negativen Befunden immunhistologischer Untersuchungen differenziert werden. Der Befund wurde als positiv bezeichnet, wenn das Myokard mit mehr als 2 Lymphozyten pro Gesichtsfeld infiltriert war, eine erhöhte Makrophagenzahl oder eine vermehrte HLA- und Adhäsionsmolekülexpression nachweisbar waren. Bei einem negativen Befund konnten keinerlei entzündliche Reaktionen immunhistologisch registriert werden. Insgesamt stellte sich heraus, daß kein direkter Zusammenhang zwischen einem positiven oder einem negativen Entzündungsgrad und einer pathologischen ANT-ratio besteht, wenn man alle Oberflächenmarker gemeinsam betrachtet.

Im Folgenden wurde dargelegt, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der infiltrierenden Entzündungszellen und dem ANT-Expressionsmuster besteht. Dafür wurde jeweils die Erstbiopsie verwendet.

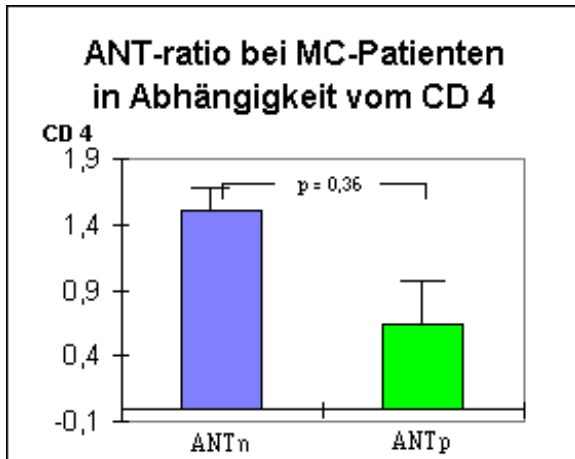
a)



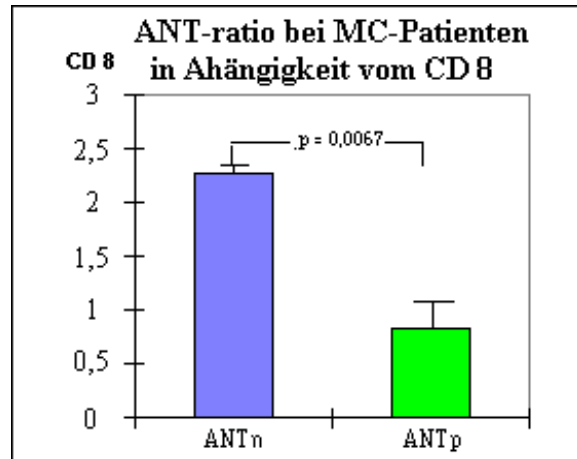
b)



c)



d)



e)

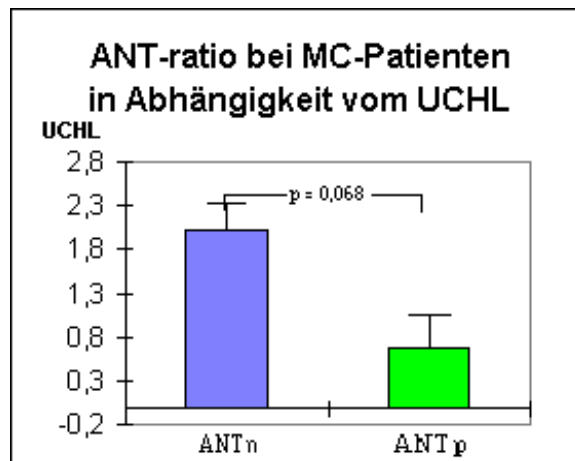


Abb.:10 Zusammenhang der immunhistologischen Parameter CD2 (a), CD3 (b), CD4 (c), CD8 (d) und UCHL (e) mit der ANT-ratio

Es läßt sich erkennen, daß die Patienten mit der normalen ANT-ratio eine größere Menge entzündlicher Infiltrate aufweisen, als die mit einer pathologischen ANT-ratio. Aus den p-Werten von $p = 0,045$ für CD 2, von $p = 0,043$ für CD 3 und $p = 0,0067$ für CD 8 kann man sehen, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den MC-Erkrankten mit normaler und denen mit verschobener ANT-ratio besteht. Beim UCHL besteht ein annähernd signifikanter p-Wert von 0,068 und bei CD 4 liegt mit einem p-Wert von 0,36 überhaupt keine Signifikanz vor.

4.4 Bedeutung der myokardialen viralen RNA-Infiltration für die ANT-Expression

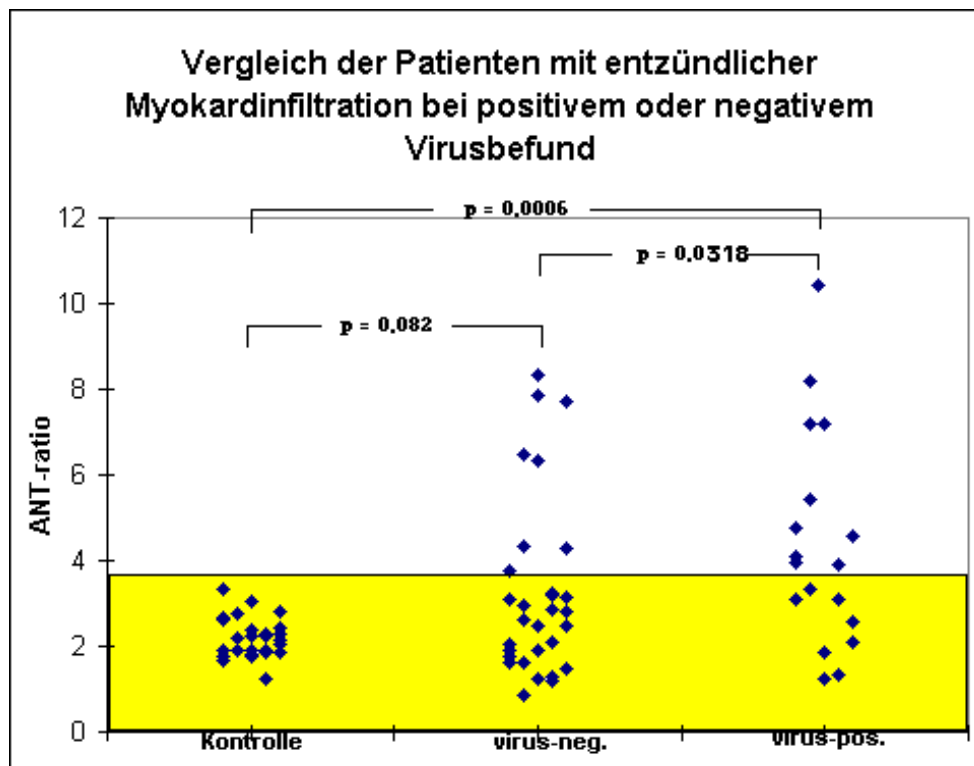
Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) war es möglich, enterovirale RNA im Herzmuskelgewebe von Myokarditispatienten und Kontrollpersonen nachzuweisen. Innerhalb des Kontrollkollektives konnte nur bei zwei Personen Virus-RNA nachgewiesen werden (7 %). Bei den 62 untersuchten Myokarditispatienten konnte in 27 Fällen ein positiver Virusnachweis (43,5 %) und in 35 Fällen ein negativer Virusnachweis (46,5

%) erfolgen. Die 40 untersuchten DCM-Patienten zeigten in 16 Fällen einen positiven (40 %) und in 24 Fällen einen negativen (60 %) Virusnachweis.

Es besteht zwischen der Kontrollgruppe und den virusnegativen MC-Patienten mit einem $p = 0,082$ keine Signifikanz. Bei dem Vergleich der viruspositiven Patienten mit der Kontrollgruppe liegt mit einem p -Wert von 0,0006 ein hoch signifikanter Unterschied vor. Zwischen viruspositiven und virusnegativen Patienten mit entzündlicher Herzerkrankung läßt sich mit einem $p = 0,0318$ ein ebenfalls signifikanter Unterschied nachweisen. Folglich kann man festhalten, daß Viruspositivität und geringe Myokardinfiltration gemeinsam ein sehr hohes Risiko für eine verschobene ANT-Isoformexpression darstellen.

Die Auswertung zeigte, daß lange nicht jede Virusinfektion zwangsweise zu einer Veränderung der ANT-Expression führt. Dennoch kann ein Zusammenhang zwischen viraler Infektion und einer Änderung des ANT-Expressionsmodells vor allen bei den MC-Patienten nicht geleugnet werden.

Abb.: 11



Von den viruspositiven Myokarditispatienten ($n = 27$) besaßen 15 (56 %) ein verändertes ANT-Expressionsmuster und 12 Patienten (44 %) eine normale Expressionsverteilung.

Bei den virusnegativen MC-Patienten ($n = 35$) wiesen 10 Personen (29 %) ein pathologisches und 25 (71,43 %) ein normales ANT-Expressionsmuster auf.

Die viruspositiven DCM-Patienten ($n=16$) zeigten in 16 Fällen (100%) ein pathologisches ANT-Expressionsverhalten. Die Virusnegativen hingegen wiesen in 20 Fällen (83,3%) einen ANT-Expressionsanteil außerhalb und in 4 Fällen (16,7%) einen innerhalb des Normbereiches auf.

Bei den DCM-Patienten jedoch zeigt der p -Wert von 0,24 keinen signifikanten Unterschied.

Folgende Tatsache ist bei den Messungen zu beachten. Virale RNA ist oft nur in der Anfangsphase der Erkrankung nachweisbar. Man kann nicht davon ausgehen, daß es bei einem chronischen Krankheitsverlauf immer zur Viruspersistenz kommt. Die meisten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme nicht mehr in der Akutphase ihrer Erkrankung. Meistens wurden sie erst bei fortgeschrittener Erkrankung aus anderen Kliniken aufgrund schlechter Behandlungserfolge in die Universitätsklinik zur weiteren Diagnostik überwiesen. Daher war es nicht möglich alle Virusinfektionen zu erfassen.

Im Folgenden soll untersucht werden ob die ANT-Isoformexpression bei viruspositiven MC-Patienten, die eine entzündliche Myokardinfektion aufweisen (siehe positiv bewertete Befunde in Tab. 5) beeinflußt werden kann von einzelnen immunhistologischen Parametern. In (4.3) wurde bereits untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Parametern und der ANT-ratio alleine besteht, jetzt kommen noch die Kriterien Viruspositivität oder Virusnegativität hinzu. Es wurde nur der CD 3 verwendet.

Abb.: 12 a

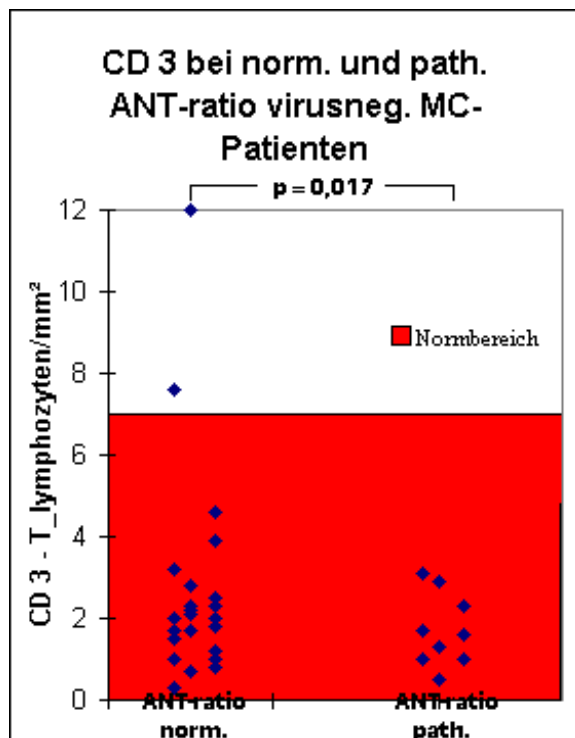
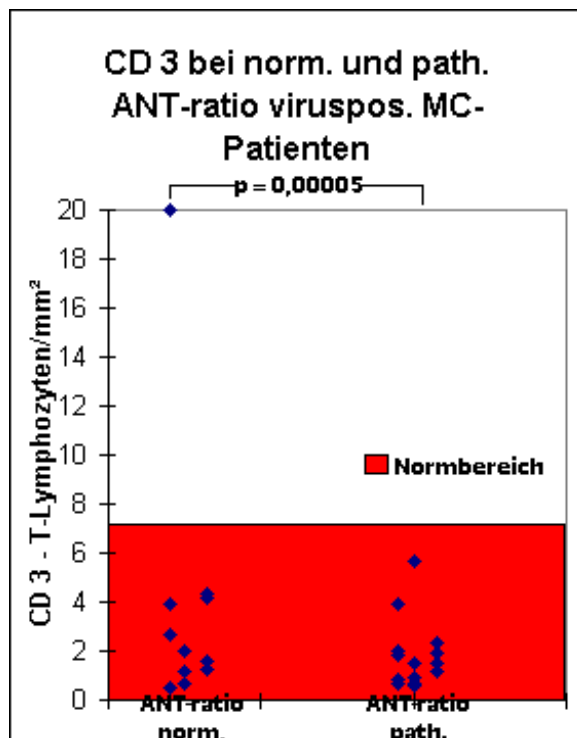


Abb.: 12 b



Es fällt auf, daß die p-Werte durchaus signifikant sind, so liegt bei den viruspositiven MC-Patienten mit einem p von 0,00005 sogar höchste Signifikanz vor.

4.5 Verlaufsbiopsien Teil 1

Bei Patienten, deren Erstbiopsien einen grenzwertigen oder positiven Befund hatten, wurden in Abständen von einem bis zehn Monaten Verlaufsbiopsien entnommen. Einige Myokarditiskranke wurden bis zu fünf mal kontrollbiopsiert. Hierdurch war es möglich, den Krankheitsverlauf zu beurteilen.

Definitionsgemäß liegen bei der DCM keine entzündlichen Infiltrate vor. Daher war es hier nicht nötig, Kontrollbiopsien zu entnehmen, um die entzündliche Infiltration zu kontrollieren. Es existieren folglich keine Verlaufsbiopsien.

Anhand der Kontrollbiopsien bestand die Möglichkeit den Verlauf der ANT-Expression in Zusammenhang mit verschiedenen schon vorab erwähnten Parametern zu beurteilen.

4.5.1 Entzündungsgrad

Demgegenüber veränderte sich im Verlauf der Erkrankung bei sechs Patienten die Anzahl der immunhistologisch nachgewiesenen Infiltrate (Patientennr. 2, 9, 20, 37, 53, 58). Trotz der Änderungen der Immunhistologiebefunde blieben die entsprechenden ANT-Verteilungsmuster erhalten.

4.5.2 Virus

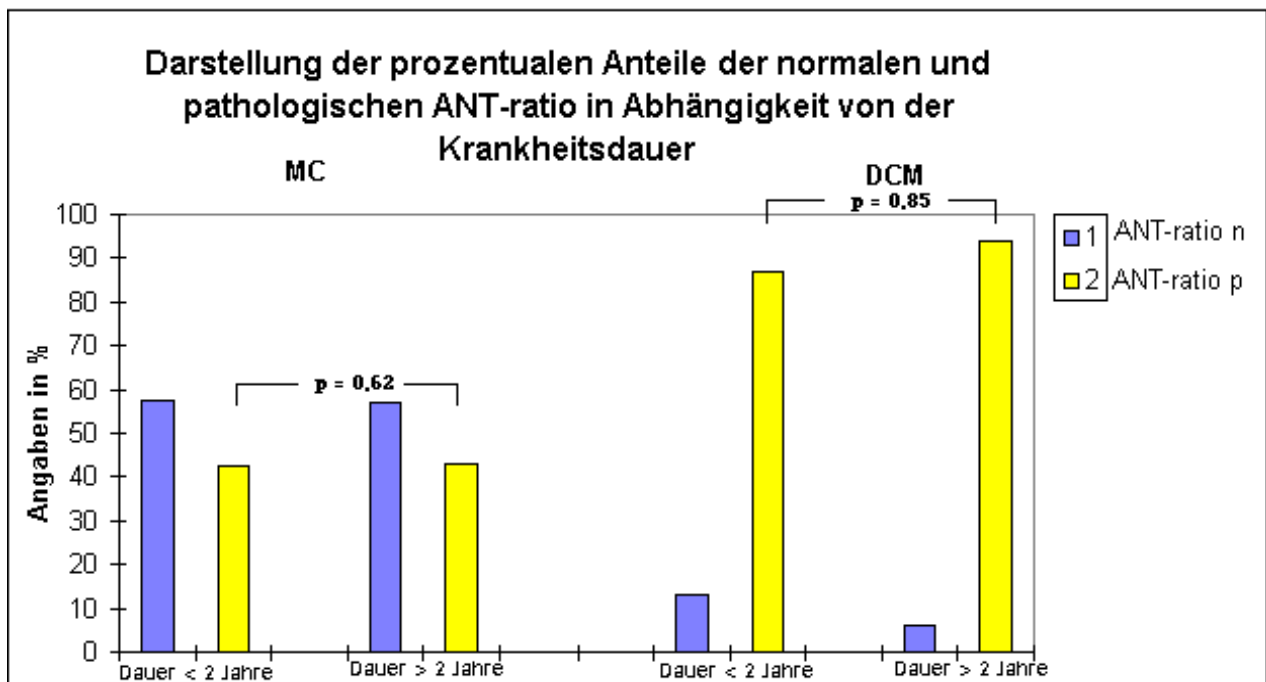
Wie schon in 4.4 beschrieben, neigen Patienten mit positivem Virusbefund eher dazu ein pathologisches Isoformmuster zu entwickeln als jene mit negativem Virusnachweis. Bleibt jetzt nur noch zu untersuchen, ob eine Viruspersistenz nötig ist, damit die ANT-Expression dauerhaft verändert bleibt. Denn virale RNA ist meist nur in der Anfangsphase der Erkrankung nachweisbar, und es kommt nicht notwendigerweise bei einem chronischen Krankheitsverlauf zu einer Viruspersistenz. So war bei zwei Patienten in allen Verlaufsbiopsien ein Virus nachweisbar („Viruspersistenz“) (Patientennr. 29, 49) bei vier anderen überhaupt nicht (Patientennr. 26, 46, 53, 54). Wiederum vier hatten in mindestens einer Biopsie einen positiven und in mindestens einer Biopsie einen negativen Virusnachweis (Patientennr. 2, 17, 28, 37). Bei all diesen Patienten blieb ein einmal erworbener Isoformshift auch in den Verlaufsbiopsien erhalten, unbeeinflusst davon, ob eine Viruspersistenz vorlag oder nicht. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß zwar ein Viruseinfluß auf die ANT-Expressionsänderung besteht, für deren Aufrechterhaltung jedoch keine Viruspersistenz notwendig ist.

4.6 Bedeutung der Krankheitsdauer für die ANT-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Herzmuskelbiopsien von Patienten untersucht, die eine unterschiedlich lange Krankheitsdauer aufwiesen. Einige litten erst seit wenigen Monaten unter der Erkrankung andere hingegen seit mehr als zehn Jahren. Um zu überprüfen, ob die ANT-Verschiebung einen Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf darstellt, wurden die Myokarditispatienten in zwei Gruppen geteilt. Der eine Teil wies eine Myokarditisanamnese von höchstens zwei Jahren auf (Gruppe 1, n = 26), beim anderen Teil lag die Erkrankung schon seit länger als zwei Jahren vor (Gruppe 2, n = 35). Von einem Patienten war mir die Krankheitsdauer nicht bekannt, daher wurde er in diesem Teil meiner Arbeit nicht berücksichtigt.

Auf gleiche Weise wurden auch die DCM-Patienten eingeteilt. Hierbei umfaßte Gruppe 1 (Krankheitsdauer unter zwei Jahren) n = 23 Patienten und Gruppe 2 (Krankheitsdauer größer zwei Jahren) n = 17 Patienten.

Abb.: 13



Bei den MC-Patienten wiesen innerhalb der ersten Gruppe 11 Patienten (42,3 %) eine veränderte ANT-ratio auf. Bei der zweiten Gruppe konnte bei 15 Patienten (42,86 %) ein pathologisches Verteilungsmuster nachgewiesen werden.

Beim DCM-Patientenkollektiv hatten 20 Patienten (86,9 %) innerhalb der ersten und 16 Patienten (94 %) innerhalb der zweiten Gruppe eine pathologische ANT-Expression.

Diese Werte lassen darauf schließen, daß die ANT-Expression in keinerlei Zusammenhang mit der Krankheitsdauer steht. Es besteht kein signifikanter Unterschied, da der p-Wert der MC-Patienten mit einer pathologischen ANT-ratio im Vergleich Gruppe I zu Gruppe II nur 0,62 beträgt. Bei den DCM-Patienten liegt der p-Wert bei 0,85.

4.7 Bedeutung des allgemeinen Krankheitszustandes des Patienten für die ANT-Expression

Nur wenige der Patienten litten lediglich unter einer Myokarditis oder einer dilatativen Kardiomyopathie. Die meisten wiesen noch andere pathologische kardiale Symptome wie Hypertonie, EKG-Veränderungen, Perikardergüsse, periphere Ödeme und andere Stauungszeichen auf. Andere hingegen litten noch zusätzlich unter Krankheiten, die nicht direkt das Herz betrafen. Diese waren z.B. Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Bronchialcarcinome, Tuberculose und Polyarthrit. Um zu überprüfen, ob die ANT-Expression abhängig vom allgemeinen klinischen Zustand der einzelnen Patienten war, wurden diese in drei Gruppen eingeteilt.

I: Bei den Patienten wurde nur ein Verdacht auf Myokarditis/DCM diagnostiziert.

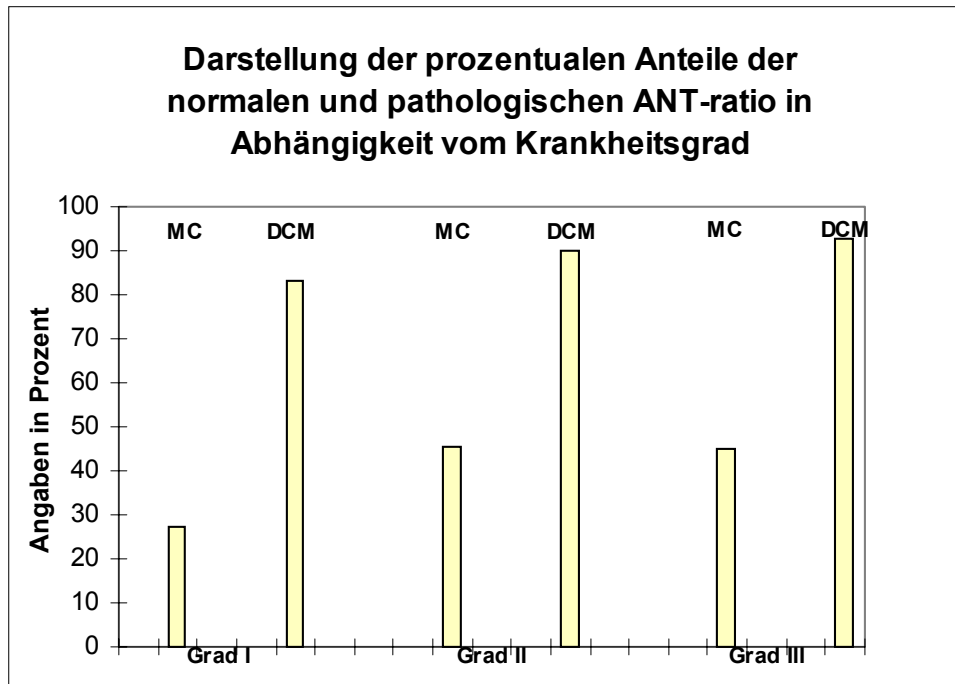
II: Die Patienten litten neben dem Verdacht auf eine Myokarditis/DCM noch unter mindestens einer weiteren pathologischen, kardialen Symptomatik (s.o.).

III: Bei den Patienten lag neben dem V. a. eine Myokarditis/DCM und einer eventuellen weiteren pathologischen, kardialen Symptomatik noch mindestens eine Krankheit eines extrakardialen Organs vor.

Bei den MC-Patienten bestand die Gruppe I aus elf , die Gruppe II aus 22 und die Gruppe III aus 27 Patienten.

Bei den DCM-Patienten bestand die Gruppe I aus 6, die Gruppe II aus 20 und die Gruppe III aus 14 Patienten.

Abb.: 14



In der Myokarditisgruppe wiesen von den Patienten der Gruppe I 3 (27,3 %) ein pathologisches Expressionsmuster auf. In der Gruppe II waren es 10 (45,45 %), und von der Gruppe III waren es 13 (44,8 %) Personen.

Im DCM-Patientenkollektiv wiesen innerhalb der Gruppe I 5 Personen (83,26 %) ein pathologisches ANT-Isoformmuster auf. Innerhalb der Gruppe II waren es 18 (90 %) und innerhalb der Gruppe III 13 Patienten (92,9%).

Tab.: 4a Krankheitsgrad-p-Werte bei MC-Patienten
mit pathologischer ANT-ratio

p-Wert	Grad I	Grad II	Grad III
Grad I	×	p = 0,398	p = 0,38
Grad II	p = 0,398	×	p = 0,619
Grad III	p = 0,38	p = 0,619	×

Tab.: 4 b Krankheitsgrad-p-Werte bei DCM-Patienten
mit pathologischer ANT-ratio

p-Wert	Grad I	Grad II	Grad III
Grad I	×	p = 0,04	p = 0,31
Grad II	p = 0,04	×	p = 0,2
Grad III	p = 0,31	p = 0,2	×

Anhand dieser p-Werte kann man sehen, daß bei den MC-Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsgraden bestehen. Alle Werte liegen zwischen 0,619 und 0,38.

Bei den DCM-Patienten mit pathologischer ANT-ratio liegen die p-Werte zwischen 0,31 und 0,04 also deutlich tiefer. Zwischen Grad I und Grad II liegt mit einem p = 0,04 sogar ein signifikanter Unterschied vor. Als Ergebnis kann man festhalten, daß bei Patienten mit multiplen Herzerkrankungen eine Tendenz dazu besteht öfters eine pathologische ANT-Expression aufzuweisen, als Personen, bei denen vorwiegend extrakardiale Organe geschädigt sind. Statistisch ist diese Tendenz jedoch meist nicht als signifikant zu werten.

4.8 Verlaufsbiopsien Teil 2

4.8.1 Hämodynamik

Obwohl sich bei vier Patienten unter der Therapie die hämodynamische Herzfunktion besserte (Patientennr. 21, 38, 50, 55) oder auch bei sechs verschlechterte (Patientennr. 12, 26, 28, 29, 34, 53) blieb eine einmal stattgefundene Änderung der ANT-Werte bestehen.

4.8.2 Krankheitsstadium

Bei den Patienten, die mehrfach biopsiert wurden, war es möglich, den Krankheitsverlauf zu begutachten. Es bleibt nun zu beurteilen, ob eine Veränderung der ANT-Expression Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hat. So wurde das klinische Befinden dieser Leute über mehrere Jahre betrachtet. Zu den klinisch erhobenen Daten zählten die Veränderungen des Allgemeinzustandes, der Belastbarkeit (NYHA, Treppenstagen), der Hämodynamik und auch allgemein des subjektiven Befindens der einzelnen Patienten. Dies alles wurde verglichen mit der ANT-Isoformverteilung. Hierbei konnte festgestellt werden, daß das ANT-Verteilungsmuster im weiteren Krankheitsverlauf nicht mehr wesentlich verändert wurde. Man kann sagen, daß ein bei Krankheitsbeginn eingetretener ANT-Isoformshift im weiteren Krankheitsverlauf, gleichgültig, ob Befundbesserung oder -verschlechterung vorliegt, unverändert blieb. So verschlechterte sich das Allgemeinbefinden und die Belastbarkeit von neun Patienten (Nr. 3, 9, 12, 14, 26, 33, 43, 46) deutlich. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um ältere Patienten, die z.T. unter mehreren Begleiterkrankungen

(fünf dieser Patienten waren dem Krankheitsgrad III zuzuordnen) litten. Bei acht Erkrankten (Nr. 5, 11, 15, 20, 24, 34, 51, 53) trat keine Veränderung des Krankheitszustandes ein. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um männliche Kandidaten, die unterschiedlichen Alters waren. Nur drei von ihnen waren dem Krankheitsgrad III zuzuordnen. Bei zehn Personen (Nr. 2, 17, 21, 23, 25, 29, 37, 49, 54, 62) trat eine deutliche Befundverbesserung ein. Dies waren hauptsächlich jüngere Patienten, nur zwei waren älter als 70 Jahre. Außerdem hatten sie deutlich weniger Begleiterkrankungen als die Patienten, bei denen eine Befundverschlechterung eingetreten war.

Tab.: 5 Aufschlüsselung der Befundänderungen bei pathologischen oder normalen ANT-Expressionen bei MC-Patienten mit Verlaufsbiopsien

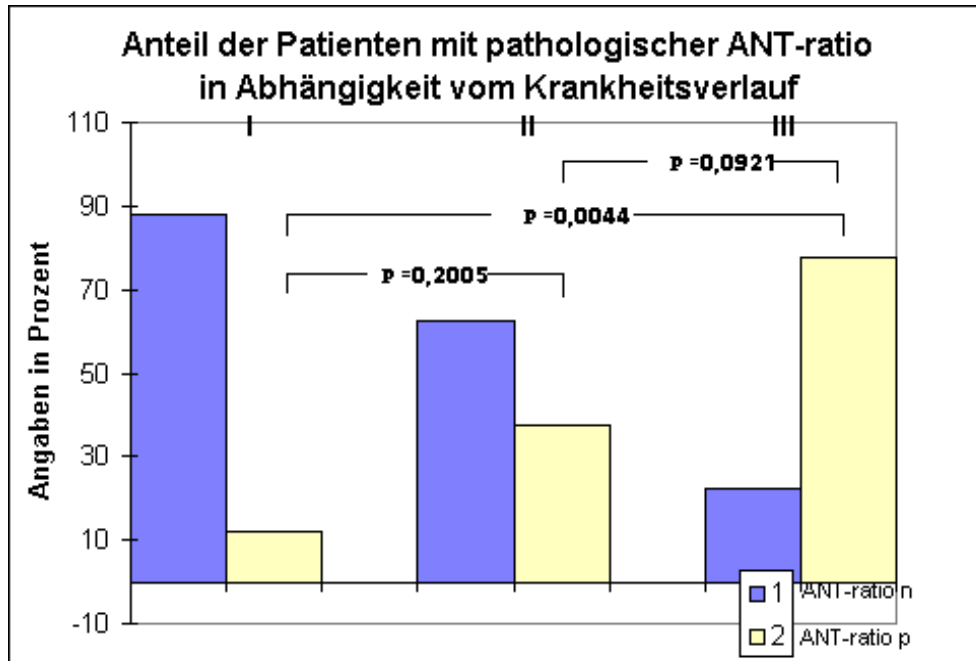
	ANT pathologisch	ANT normal
Befundverbesserung	1	8
keine Befundänderung	3	5
Befundverschlechterung	7	2

Stellt sich nun die Frage, ob die ANT-Expressionsänderungen prognostische Aussagen für den Krankheitsverlauf zulassen. Hierbei zeigte sich, daß Patienten mit pathologischen ANT-Werten weitaus häufiger eine Krankheitsverschlechterung zeigten als Patienten mit einer normalen ANT-Expression. All diese Patienten waren schlechter belastbar, konnten weniger Treppenstiegen steigen und hatten insgesamt verminderte Gehstrecken, ihre Hämodynamik und ihr Allgemeinbefinden verschlechterte sich im weiteren Krankheitsverlauf stetig und es ließen sich nur dürftige Therapieerfolge festmachen.

So wiesen 88% (n = 8) der Patienten, bei denen sich das Krankheitsbild unter der Therapie besserte eine ANT-Expression innerhalb und nur 12% (n = 1) eine außerhalb des Normbereiches auf.

Jene Erkrankte, deren klinisches Befinden sich im Verlauf nicht änderte, hatten zu 62,5% (n = 5) ein normales und zu 37,5% (n = 3) ein pathologisches ANT-Verteilungsmuster.

Die Personen jedoch, deren Zustand sich stark verschlechterte hatten zu 22,3% (n = 2) normale und zu 77,7% (n = 7) pathologische ANT-Werte.



Wie die p-Werte zeigen besteht mit einem $p = 0,0044$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Befundverbesserung und -verschlechterung. Zwischen den Patienten ohne Befundänderung und denen mit Befundverbesserung besteht mit $p = 0,2005$ keine Signifikanz. Bei den Patienten mit Befundverschlechterung und denen ohne Befundänderung beträgt der p-Wert 0,0921. Er zeigt lediglich tendentiell eine Signifikanz, ist statistisch jedoch nicht als eindeutig zu werten.

Da die ANT-Expressionsänderung ein Ereignis zu Beginn der Erkrankung darstellt, das zumindestens für einen langen Zeitraum (wahrscheinlich für immer) bestehen bleibt, kann man sagen, daß Patienten mit pathologischer ANT-Verteilung eine schlechtere Prognose haben als solche mit normalen Werten.

Die Verlaufsmessungen der einzelnen Patienten zeigten, daß Patienten, die einmal eine veränderte ANT-Expression hatten, diese auch in ihrem weiteren Krankheitsverlauf beibehielten. Ebenso zeigten die Personen, die bei ihrer Erstbiopsie ein normales ANT-Verteilungsmuster aufwiesen, auch im weiteren Krankheitsverlauf ANT-Werte im Normbereich und einen deutlichen Trend in der Befundbesserung.

5 Diskussion

Im Myokard von MC-Patienten kommt es in Abhängigkeit von einer enteroviralen Infektion und einer geschwächten T-Zell-abhängigen Immunantwort zu einer Expressionsveränderung der ANT-Isoformen. Der ANT 1-Anteil erhöht, der vom ANT 2 verringert sich und der des ANT 3 bleibt annähernd konstant.

Eine solche Veränderung ist auch bei Patienten mit DCM, ein mögliches Folgestadium einer MC, nachzuweisen, während Patienten mit KHK oder Herzklappenfehler keine veränderte myokardiale ANT-Expression erkennen lassen.

5.1 Eine myokardiale enterovirale Infektion ist mit einer veränderten ANT-Isoformexpression assoziiert

Um die Bedeutung der Enterovirusinfektion für die ANT-Genexpressionsänderung näher zu analysieren, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Biopsien mittels PCR auf enterovirale RNA untersucht. Nur zwei Patienten des Kontrollkollektives (8%), jedoch 43,5% der MC- und 40 % der DCM-Patienten zeigten einen positiven Virusnachweis. In der Literatur liegen die Werte bezüglich des Virusnachweises für MC zwischen 7-47%, für DCM zwischen 0-46% und für Kontrollkollektive zwischen 0-17% (32, 33). Eine frühere Studie belegt, daß Patienten mit KHK, Vitien oder toxischer Kardiomyopathie keine virale RNA in ihrem Myokard aufweisen (50). Somit liegt der Schwerpunkt der Virusinfektion im MC- und DCM-Patientenkollektiv.

Innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Virusbefall zeigen sich gewöhnlich die ersten kardialen Symptome. Es kommt zu fleckförmigen Fibrosierungen des Endo- und Myokards, zum scholligen Zerfall der Myokardiozyten, zu regressiven Verkalkungen und zur Ausdünnung und Desorganisation retikulärer Fasern. Im Endstadium einer Virusmyokarditis ist eine erhebliche interstitielle Myokardfibrose mit Herzwandausdünnung und Herzkammererweiterung nachzuweisen (17). Je nach dem Immunstatus, der genetischen Prädisposition und der Summe der Begleiterkrankungen bildet sich die Myokarditis innerhalb von vier Monaten zurück oder wird chronisch.

Bei einem chronischen Verlauf besteht keinerlei Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer, der Viruspersistenz und der Menge an immunhistologisch nachweisbaren Infiltraten. Es gibt jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Veränderung der ANT-Isoformexpression. Im Gesamtkollektiv aller untersuchten MC-Patienten besaßen nur 29 % der virusnegativen Personen jedoch 56 % der viruspositiven eine pathologische ANT-Verteilung.

Bei den virusnegativen Patienten mit pathologischem ANT-Muster spielt sicherlich der Zeitpunkt der Biopsieentnahme (s.o.) und die Wirtsgenetik eine wichtige Rolle. Es ist anzunehmen, daß einige der nun virusnegativen Patienten zu einem früheren Krankheitszeitpunkt viruspositiv gewesen sind. Damals erfolgte dann der ANT-Isoformshift, welcher nicht reversibel ist. Ferner ist zu beachten, daß sich viele der Patienten in einem Spätstadium ihrer Erkrankung befanden, da sie erst einige Zeit nach ihrem Krankheitsausbruch

aufgrund schlechter Heilungserfolge an die Uniklinik überwiesen wurden. Daher war ein positiver Virusnachweis teilweise nicht mehr möglich.

Einige viruspositive Patienten weisen kein pathologisches ANT-Muster auf. Dieses könnte im Zusammenhang mit der Existenz verschiedener Subtypen des Coxsackie-B-Virus stehen. Einige scheinen einen Isoformshift auszulösen und andere nicht. Dies kann auch eine Erklärung dafür sein, daß manche virusnegative Patienten eine veränderte ANT-Isoformexpression haben. Eventuell sind sie von Virussubtypen infiziert, die mit unseren labortechnischen Methoden zwar nicht nachweisbar sind, aber dennoch die ANT-Verteilung beeinflussen.

Weiterhin scheint die Viruspersistenz keine zwingende Voraussetzung für den weiteren Verlauf der Erkrankung zu sein. Sie ist nicht verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion oder den Übergang in eine chronische Myokarditis bzw. in eine DCM.

5.2 Die Rolle der T-zellabhängigen Immunreaktion

Wenn man von der Tatsache ausgeht, daß die Virusinfektion eine Art Trigger für einen ANT-Isoformshift darstellt, dann ist es nicht verwunderlich, daß ein durchaus relevanter Unterschied zwischen Patienten mit normaler und pathologischer Isoformexpression bei entzündlicher Myokardinfektion besteht. Myokard mit normaler ANT-Verteilung weist wesentlich höhere T-Lymphozyteninfiltrate auf, als jenes mit pathologischem Verteilungsmuster. Man kann also sagen, daß ein ANT-Isoformshift meist in Herzen auftritt, die zwar eine Virusinfektion aufweisen, jedoch wenig Lymphozyteninfiltrate haben. Eine starke Entzündungsreaktion als Ausdruck einer aktiven, zellulären Immunantwort scheint protektiv zu wirken, und das Herz vor einem ANT-Shift zu schützen.

Bei einer Studie mit Coxsackie-B3-infizierten Mäusen, bei denen die CD8-Lymphozyten eliminiert wurden, zeigte sich ein enormer Virustiteranstieg (54,55). Die CD8-Lymphozyten wirken viruseliminierend, sie schützen das Gewebe daher indirekt vor einem ANT-Isoformshift. So zeigt das Herzmuskelgewebe, welches hohe CD8-Lymphozyteninfiltrate aufweist, sehr häufig eine normale ANT-Isoformverteilung.

Bei den DCM-Patienten lag definitionsgemäß keine entzündliche Infiltration vor. Dennoch liegt hier eine starke ANT-ratio-Veränderung vor, da die protektive Entzündung fehlt.

5.3 Die Hämodynamik und die Krankheitsdauer haben keinerlei Einfluss auf die ANT-Verteilung

Es ließen sich keinerlei Zusammenhänge zwischen der ANT-ratio und der Druck- und Volumenbelastungen des Herzens nachweisen. Dies zeigte sich sowohl bei den MC- als auch bei den DCM-Patienten. Schon in einer japanischen Studie wurde ermittelt, daß keinerlei Relation zwischen der Hämodynamik und einem positiven ANT-Antikörpernachweis besteht (48).

Gestörte myokardiale Druck- und Volumenbelastungen kommen bei vielen Herz- Kreislauferkrankungen vor. Sie sind keineswegs spezifisch für eine Myokarditis oder Kardiomyopathie. Bei all diesen anderen Erkrankungen kommt es zu keinen ANT-Veränderungen. Gäbe es einen Zusammenhang zwischen ANT-

ratio und Hämodynamik, wäre ein ANT-Isoformshift sicher häufiger bei allen cardialen Erkrankungen zu beobachten.

Es ist anzunehmen, daß bei einer langen Krankheitsdauer von MC oder DCM häufiger ANT-Isoformexpressionsänderungen auftreten als bei einem kurzen Verlauf. Es steht eine längere Zeitspanne zur Verfügung. Dies ist jedoch keineswegs der Fall. So erfolgt ein ANT-Isoformshift in der Anfangsphase der Erkrankung und nicht erst wenn diese einen chronischen Verlauf hat. Diese Expressionsänderung bleibt dann dauerhaft bestehen, ganz egal ob sich ein rasches Ausheilen oder ein chronischer Verlauf der Erkrankung einstellt. Der ANT-Isoformshift ist daher krankheitsdauerunabhängig.

5.4 Ist ein multipel geschädigter Herzmuskel anfälliger für eine ANT-Isoformverschiebung?

Patienten mit multiplen Herz-Kreislaufkrankungen (Gruppe II) weisen häufiger eine Isoformveränderung auf als nur an MC oder DCM erkrankte Leute (Gruppe I). Patienten, die außerdem an extrakardialen Organen geschädigt sind, zeigen ebenfalls häufiger eine abgewandelte ANT-ratio. Eine Erklärung wäre, daß solche Patienten, die durch ihre Vorerkrankungen abwehrgeschwächt sind leichter eine myokardiale Virusinfektion bekommen können. Hierdurch wird dann bekanntermaßen der ANT-Isoformshift begünstigt. Andererseits könnte eine virale Infektion zu einer Abwehrschwäche des Immunsystemes führen. Diese führt dann zu intrazellulären Veränderungen und einem schweren Krankheitsverlauf.

5.5 Welche Mechanismen beeinflussen die ANT-Isoformexpressionsänderung?

Genaue Mechanismen für den Zusammenhang zwischen viraler Infektion und ANT-Veränderung sind noch unklar. Eine Virusinfektion kann zu autoimmunologischen Prozessen im Wirtsorganismus führen. Dies geschieht entweder durch die Freigabe oder Expression versteckter Antigene oder durch antigenetische Determinanten, die sich der Virus und die Gastzelle teilen. Andererseits scheint das Virus die Produktion von Cytokinen und anderen Entzündungsmediatoren wie z.B. NO auszulösen. Diese an sich können den molekularbiologischen und biochemischen Prozess der Myozyten verändern. So konnten bei Mäusen, die an einer chronischen MC litten, eine starke Anhäufung von Cytokinen nachgewiesen werden, obwohl die histologischen Infiltrate bereits abgesunken waren (55, 56). Cytokine und NO scheinen den zeitabhängigen, programmierten Zelltod der Herzmyozyten zu begünstigen. Bei der Apoptose spielt der ANT eine wichtige Rolle (57). Eine solche Anhäufung von Cytokinen und NO wurde ebenfalls im Myokard von an MC oder DCM erkrankten Patienten gefunden (55).

In einem Tiermodell (59) wird das Cocksackie-B3-Virusgenom in Mäuseoocyten implantiert. Dieses löst dann bei den sich entwickelnden Mäusen eine DCM aus. Es löst daher völlig unabhängig vom Immunstatus der Tiere und seinen zytopathischen Effekt aus. Die reine Expression der viralen Proteine an sich reicht also schon, um eine DCM auszulösen.

5.6 Welche Konsequenzen hat der ANT-Isoformshift für das Myokard und welche prognostischen Aussagen läßt er zu?

Im Herzmuskelgewebe von Coxsackie-B3-infizierten A/J-Mäusen ließ sich eine Akkumulation von ATP in den Mitochondrien nachweisen. Gleichzeitig zeigte sich eine Akkumulation von ADP im Cytosol. Ein solches Ungleichgewicht in der ATP / ADP-Verteilung weist auf eine gestörte ANT-Funktion, die mit einer gestörten Herztätigkeit korrelierte, hin. Eingeschränkte Myokardfunktion korreliert daher mit einem ANT-Isoformshift.

Daher ist es nicht verwunderlich, daß Patienten mit einem pathologischen ANT-Isoformshift fast alle in ihrem Krankheitsverlauf schlechter belastbarer und therapierbarer waren. Jene mit einer normalen ANT-ratio zeigten einen deutlicheren Trend zur Befundbesserung. Langzeituntersuchungen müssen den Trend beweisen, daß Patienten mit in der Frühphase erfahrenem ANT-Isoformshift eine schlechtere Prognose haben. Die besten Aussichten haben diejenigen, bei denen zu Krankheitsbeginn eine hohe Myokardinfiltration mit T-Lymphozyten und keine Virusinfektion vorlag.

6 Zusammenfassung

Herzmuskelentzündungen werden meist durch Enteroviren ausgelöst. Bei diesen Virusmyokarditiden oder dilatativen Kardiomyopathien kann es zu einer krankheitsspezifischen Verschiebung des ANT-Expressionsmusters im Herzmuskelgewebe kommen. Der ANT 1-Anteil ist bei einem erniedrigtem ANT 2- und unveränderten ANT 3-Anteil erhöht. Der ANT ist verantwortlich für den Transport von ADP und ATP über die innere Mitochondrienmembran und spielt daher eine wichtige Rolle im zellulären Energiestoffwechsel und der Apoptose. Es stellte sich nun die Frage, welche Faktoren für die ANT-Isoformverschiebung verantwortlich gemacht werden könnten. Dazu untersuchten wir myokardiale Biopsien von Patienten mit dem klinischen V.a. eine MC oder DCM.

38,7 % der MC - und 87,5 % der DCM-Patienten waren von einer Verschiebung des ANT-Isoformexpressionsmusters betroffen. Jenes wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestimmt. Es bestand keinerlei Zusammenhang zwischen den in der Herzkatheteruntersuchung ermittelten Hämodynamikdaten und der ANT-Verteilung. Ferner hatte die Krankheitsdauer keinerlei entscheidenden Einfluss.

Es bestand hingegen eine enge Korrelation zwischen dem Nachweis enteroviralem Genoms im Myokard und der abgewandelten ANT-Verteilung. Mittels der PCR war es möglich, enterovirale RNA im Herzmuskelgewebe nachzuweisen. Bei 56 % der viruspositiven MC-Patienten und sogar 100 % der viruspositiven DCM-Patienten lag ein ANT-Isoformshift vor. Jedoch zeigten Patienten mit einer normalen ANT-Verteilung signifikant häufiger entzündlich bedingte Lymphozyteninfiltrationen. Diese konnten mit immunhistologischen Techniken bestimmt werden. Nicht alle viruspositiven Patienten hatten eine veränderte ANT-Isoformexpression. Jene mit normaler ANT-Verteilung wiesen deutlich häufiger eine kardiale Lymphozyteninfiltration auf.

Patienten, die durch ihre Vorerkrankungen abwehrgeschwächt sind, können leichter eine myokardiale Virusinfektion bekommen. Hierdurch wird dann bekanntermaßen der ANT-Isoformshift begünstigt. Untersuchungen an Verlaufsbiopsien ergaben, daß Patienten mit einer pathologischen ANT-Verteilung in ihrem Krankheitsverlauf schlechter belastbarer und therapierbarer waren. Jene mit einer normalen ANT-Verteilung hatten eine deutlich bessere Prognose.

Eine ANT-Isoformexpressionsänderung tritt gehäuft bei einer enteroviralen Infektion und einer geschwächten T-zellabhängigen Immunantwort auf. Eine starke kardiale Lymphozyteninfiltration als Ausdruck einer aktiven, zellulären Immunantwort wirkt protektiv und schützt das Herz vor einem ANT-Shift. Bei einer Veränderung der kardialen ANT-Isoformexpression kommt es zu einer Funktionsstörung des ANT-Gesamtproteins des Herzens. Hierdurch wird der ATP-Transport und somit der myokardiale Energiestoffwechsel eingeschränkt.

7 Literatur

1. - **Klingenberg M, Heldt H.W:** The ADP/ATP-Translocation in Mitochondria and its Role in Intracellular Compartmentation
2. - **Krämer R, Palmieri F:** Metabolite Carriers in Mitochondria
Molecular Mechanismus in Bioenergetics: 359-379 (1992)
3. - **Klingenberg M:** Membrane Protein Oligomeric Structure and Transport Function
Macmillan Journals (1981)
4. - **Krämer R:** Functional Principles of Solute Transport Systems
Concepts and Perspectives Elsevier Science (1994)
5. - **Klingenberg M:** Structure Function of the ADP/ATP Carrier
(1992)
6. - **Walker J.E:** The Mitochondrial Transporter Family
Current Opinion in Structural Biology: 519-526 (1992)
7. - **Stepien G, Torroni A, Chung A.B, Hodge J.A, Wallace D.C:** Differential Expression of Adenine Nucleotide Translocator Isoforms in Mammalian Tissues and during Muscle Cell Differentiation
The Journal of Biological Chemistry: 14592-14596 (1992)
8. - **Li K, Warner CK, Hodge JA, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Maekawa M, Shimizu Y, Shimizu N, Wallace D.C:** A Human Muscle Adenine Nucleotide Translocator Gene has four Exons, is Located on Chromosome 4, and Is Differentially Expressed
The Journal of Biological Chemistry: 13998-14004 (1989)
9. - **Lunardi J, Attardi G:** Differential Regulation of Expression of the Multiple ADP/ATP Translocase Genes in Human Cells
The Journal of Biological Chemistry: 16534-16540 (1991)

- 10. - Li K, Hodge J.A, Wallace DC:** OXBOX, a Positive Transcriptional Element of the Heart-Skeletal Muscle ADP/ATP Translocator Gene
The Journal of Biological Chemistry: 20585-20588 (1990)
- 11. - Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D:** Molecular Biology of the Cell.
Springer Verlag 2nd Edition (1990)
- 12. - Hornbostel, Kaufmann, Siegenthaler:** Innere Medizin in Praxis und Klinik 1. Band
Thieme Verlag 4th edition (1992)
- 13. - Schultheiß H.P:** Die akute Virusmyokarditis
Fortschr. Med 109 Jg. (1991)
- 14. - Strauer B.E, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Schwartzkopff B, Schultheiß H.P:**
Myokarditis - Kardiomyopathie
Medizinische Klinik. 89: Suppl. 1. Urban & Vogel, München (1994)
- 15. - Schultheiß H.P:** Die dilatative Kardiomyopathie, eine chronische Myokarditis? Neue Aspekte zur Diagnostik und Therapie
Zeitschrift für Kardiologie. 82: Suppl.4. 25-33 (1993)
- 16. - Kayser H.K, Bienz K.A, Eckert J, Lindenmann J:** Medizinische Mikrobiologie
Thieme-Verlag 7th edition (1989)
- 17. - Riede U.N, Schäfer H.E, Wehnert H:** Allgemeine und spezielle Pathologie
Thieme Verlag 2nd edition (1989)
- 18. - Linz U, Degenhardt H:** Die Polymerase-Kettenreaktion
Springer-Verlag Naturwissenschaften 77,515-530 (1990)
- 19. - Knippers R, Philippsen P, Schäfer K.P, Fanning E:** Molekulare Genetik
Thieme Verlag 5th edition (1990)
- 20. - Schultheiß H.P, Strauer B:** Behandlung der entzündlichen Herzmuskelekrankung
Arzneimitteltherapie, 10. Jahrgang, Heft 6 (1992)
- 21. - Schultheiß H.P, Kühl U, Janda I, Schanwell M, Strauer :** Immunsuppressive Therapie der Myokarditis?

Herz Urban&Vogel: 112-121 (Nr.2) (1992)

22. - Roitt I.M: Leitfaden der Immunologie
Blackwell Wissenschaft (1993)

23. - Roitt I.M, Brostoff J, Male D.K: Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme Verlag 2nd edition (1991)

24. - Siegenthaler W: Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag 7th edition (1994)

25. - Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin
Urban & Schwarzenberg (1991)

26. - Kühl U, Daun B, Seeberg B, Schultheiß H.P, Strauer B: Dilatative Kardiomyopathie - eine chronische Myokarditis?
Herz Urban&Vogel: 97-106 (Nr.2) (1992)

27. - Schmidt R.F, Thews G: Physiologie des Menschen
Springer Verlag 24th edition (1990)

28. - Keidel W.D: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie
Thieme Verlag 5th edition (1979)

29. - Harms V: Biomathematik, Statistik und Dokumentation
Harms Verlag Kiel 5th edition (1988)

30. - Tracy S, Wiegand V, Mc Manus B, Gauntt C, Pallansch M, Beck M, Capman N: Molecular approaches to enteroviral diagnosis in idiopathic cardiomyopathy and myocarditis
J. Am Coll Cardiol 1990; 15 (7): 1688-1694

31. - Smith W.G: Adult heart disease due to the coxsackie virus group B
Brit Heart J 1966; 28: 204-220

32. - Pauschinger M, Preis S, Triesch A, Dörner A, Schultheiss H.P: Detection of enterovirale RNA in endomyocardial biopsies in patients having chronic myocarditis (MC) respectively dilated cardiomyopathy
Circulation 1994; 90 (4): 1-219

- 33. - Bowles N.E, Richardson P.J, Olsen E.G, Archard L.C:** Detection of Cocksackie-B3-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathie
Lancet 1986; 1: 1120-1123
- 34. - Schultheiss H.P, Schulze K, Kühl U, Ulrich G, Klingenberg M:** The ADP/ATP carrier as a mitochondrial autoantigen - facts and perspectives
Ann NY Acad Sci 1987; 488: 44-68
- 35. - Schultheiss H.P:** The mitochondrium as an autoantigen in inflammatory heart disease.
Eur Heart Journal 1987; 8, Suppl J: 203-210
- 36. - Schulze K, Becker B.F, Schauer R, Schultheiss H.P:** The possible value of synthetic peptides in the diagnosis and therapy of myocarditis and dilated cardiomyopathy
European Heart Journal 1991; 12, suppl D: 76-80
- 37. - Schulze K:** Promotionsarbeit
- 38. - Ahvie H, Aftab A.A, Neumann D, Besihorm W:** Inducation of major histocompatibility complex Antigens within the myocardium of patients with active myocarditis a nonhistologic marker of myocarditis
American College of Cardiology (1990); 624-632
- 39. - Hufnagel G, Maisch B:** Expression of MHC class I and II antigens and the II-2 receptor in rejection, myocarditis and DCM
European Heart Journal (1991); 12, Suppl D: 137-140
- 40. - Powell S, Medd S, Runswick M, Walker J:**Two bovine genes for mitochondrial ADP/ATP Translocase expressed differently in various tissues
American Chemical Society (1989); 28, 866-873

- 41. - Neubauer S, Krahe T, Schindler R, Horn M, Hillenbrand H, Entzeroth C, Mader H, Kromer EP, Riegger GAJ, Lackner K, Ertl G:** 31 P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease: Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure.
Circulation 1992; 86: 1810-1818
- 42. - Figulla HR, Bardosi A, Dechant K, Kreuzer H:** Enzyme histochemistry of endomyocardial biopsies in idiopathic dilated cardiomyopathy.
Cardiology 1991; 78: 282-290
- 43. - Boewer V, Wagenknecht C, Schröder G, Richter K, Meyer R, Sajkiewicz K:** Vergleichende Analyse der Enzymaktivitäten in Endomyokardproben von Patienten mit unterschiedlichen Herzmuskelerkrankungen.
Z Kardiol 1987; 76: 744-750
- 44. - Sylven C, Lin L, Jansson E, Sotonyi P, Fu LX, Waagstein F, Hjalmarsson A, Marcus C, Brönnegard M:** Ventricular adenine nucleotide translocator mRNA is upregulated in dilated cardiomyopathy.
Cardiovascular Research 1993; 27: 1295-1299
- 45. - Lunardi J, Hurko O, King Engel W, Attardi G:** The multiple ADP/ATP translocase genes are differently expressed during human muscle development.
J Biol Chem 1992; 267: 15267-15270
- 46. - Kreutzig T:** Biochemie.
Jungjohann Verlagsgesellschaft; 1989
- 47. - Pschyrembel W:** Klinisches Wörterbuch
W de Gruyter-Verlag; 1986
- 48. - Takemoto M, Kusachi S, Urabe N, Inoue K, Tsuji T:** Auto-antibody against adenine nucleotid translocator in dilated cardiomyopathy and myocarditis incidence and relation to cardiac function and morphology.
Jpn Circulation Journal 1993; 57(12), 1150-8

- 49. - Koide H, Kitaura Y, Deguchi H, Urimura A, Kawamura K, Hirai K:** Genomic detection of enteroviruses in the myocardium. Studies on animal hearts with coxsackie B3 myocarditis and endomyocardial biopsies from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy.
Jpn Circ J 1992; 56:1081-1093
- 50. - Dörner A:**Pathophysiologische Bedeutung des ANT im Krankheitsbild der DCM und MC
- 51. - A. Doerner, M. Pauschinger, A. Badorff, M. Noutsias, S. Giessen, K. Schulze, J. Bilger, U. Rauch, H.-P. Schultheiss:** Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans
FEBS Letters 414 (1997) 258-262
- 52. - A. Dörner, K. Schulze, U. Rauch, H.-P. Schultheiss:** Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: Pathophysiological alterations in expression and function
Molecular and cellular Biochemistry 174 (1997) 261-269
- 53. - H.-P. Schultheiss, K. Schulze, A. Dörner:** Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease
Molecular and cellular Biochemistry 163/164 (1996) 319-327
- 54. - A. Henke, S. Huber, A. Stelzner, JL Whitton:** The role of CD8+ T-Lymphocytes in coxsackie B3-induced myocarditis
J Virol 1995;69(11):6720-8
- 55. - A. Dörner, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss et al:** The shift in the myocardial adenine nucleotide translocator isoform expression pattern is associated with an enteroviral infection in absence of an active T-cell dependent immune response in human inflammatory heart disease
Project SFB 189, Bonn, Germany
- 56. - GL. Freeman, JT. Colston, M. Zabalgaitia, B. Chandrasekar:** Contractile depression and expression of proinflammatory cytokines and iNOS in viral myocarditis.
AM J Physiol 1998; 274 (1 Pt 2): H249-58

57. - I. Marzo, C. Brenner, N. Zamzami et al: Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis.
Science 1998; 281 (5385): 2027-31

58. - K. Schulze, B. Witzenbichler, C. Christmann, HP. Schultheiss: Disturbance of myocardial metabolism in experimental virus myokarditis by antibodies against the adenine nucleotid translocator.
Cardiovasc Res 1999; 44: 91-100

59. - R. Wessely, A. Henke, R. Zell, R. Kandolf, U. Knowlton: Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture.
Circulation 1998; 98: 450-457

8 Anhang

8.1 ANT-Verteilung bei Myokarditispatienten

Nummer	ANT1	ANT2	ANT3	ANT2 + ANT3	ANT-ratio
MC 1	71,3	25,5	3,2	28,7	2,484320557
MC 2	67,8	24,7	7,5	32,2	2,105590062
MC 3	84,4	15,1	0,5	15,6	5,41025641
MC 4	67	26,6	6,4	33	2,03030303
MC 5	79,6	19	1,4	20,4	3,901960784
MC 6	89,1	8,3	2,6	10,9	8,174311927
MC 7	86,2	9,4	4,4	13,8	6,246376812
MC 8	86,2	8	5,8	13,8	6,246376812
MC 9	81,3	11,2	7,5	18,7	4,347593583
MC 10	67,3	30,1	2,6	32,7	2,058103976
MC 11	88,5	8,2	3,3	11,5	7,695652174
MC 12	82	16	2	18	4,555555556
MC 13	46,7	37,9	15,4	53,3	0,876172608
MC 14	87	12,3	0,7	13	6,692307692
MC 15	65,8	28,2	6	34,2	1,923976608
MC 16	76,3	20,5	3,2	23,7	3,219409283
MC 17	65,2	29,5	5,3	34,8	1,873563218
MC 18	73,9	21,5	4,6	26,1	2,831417625
MC 19	89,3	8,3	2,4	10,7	8,345794393
MC 20	66,1	29,6	4,3	33,9	1,949852507
MC 21	85,2	13,5	1,3	14,8	5,756756757
MC 22	76,2	22,4	1,4	23,8	3,201680672
MC 23	73,8	15,5	10,7	26,2	2,816793893
MC 24	72,3	22,6	5,1	27,7	2,610108303
MC 25	75,7	19,8	4,5	24,3	3,115226337
MC 26	88,7	8,1	3,2	11,3	7,849557522
MC 27	71,4	26	2,6	28,6	2,496503497
MC 28	82,6	12,5	4,9	17,4	4,747126437
MC 29	77	20,2	2,8	23	3,347826087
MC 30	86,6	7,6	5,8	13,4	6,462686567
MC 31	81,1	18,3	0,6	18,9	4,291005291
MC 32	86,4	5,3	8,3	13,6	6,352941176
MC 33	73,8	19,7	6,3	26	2,838461538
MC 34	88,9	7,2	3,9	11,1	8,009009009
MC 35	75,7	17,8	6,3	24,1	3,141078838
MC 36	55,4	39,4	5,2	44,6	1,242152466
MC 37	57,3	32,7	10	42,7	1,341920375
MC 38	54	39,9	6,1	46	1,173913043
MC 39	75,7	16,7	7,6	24,3	3,115226337
MC 40	62,1	35,6	2,3	37,9	1,638522427
MC 41	59,3	33,4	7,3	40,7	1,457002457
MC 42	81,2	15,4	3,4	18,8	4,319148936
MC 43	78,9	18,6	2,4	21	3,757142857
MC 44	74,1	16,1	9,8	25,9	2,861003861
MC 45	64	30,4	5,6	36	1,777777778
MC 46	51,7	37,7	10,6	48,3	1,070393375
MC 47	78,6	19	2,4	21,4	3,672897196
MC 48	80,4	15,8	3,8	19,6	4,102040816
MC 49	67,6	24,8	7,6	32,4	2,086419753
MC 50	91,8	5,7	2,5	8,2	11,19512195
MC 51	75,7	20	4,3	24,3	3,115226337
MC 52	71,9	19	9,1	28,1	2,558718861

MC 53	69,7	18,9	11,3	30,2	2,30794702
MC 54	74,7	19,2	6,1	25,3	2,95256917
MC 55	65,6	27,8	6,6	34,4	1,906976744
MC 56	61,9	33,7	4,4	38,1	1,624671916
MC 57	79,8	15,8	4,4	20,2	3,95049505
MC 58	87,8	7	5,2	12,2	7,196721311
MC 59	55	41,4	3,7	45,1	1,219512195
MC 60	53,7	30,4	11,9	42,3	1,269503546
MC 61	67,6	31,6	0,8	32,4	2,086419753
MC 62	87,9	9,7	2,5	12,2	7,204918033

8.2 ANT-Verteilung bei DCM-Patienten

Nummer	ANT1	ANT2	ANT3	ANT2 + ANT3	ANT-ratio
DCM 1	90,6	9,4	0	9,4	9,638297872
DCM 2	88,5	7,6	3,9	11,5	7,695652174
DCM 3	90,3	7,5	2,2	9,7	9,309278351
DCM 4	84,4	4,5	11,1	15,6	5,41025641
DCM 5	86,6	8	5,4	13,4	6,462686567
DCM 6	86,7	4,9	8,4	13,3	6,518796992
DCM 7	91,1	6,4	2,5	8,9	10,23595506
DCM 8	84,4	9,2	6,4	15,6	5,41025641
DCM 9	83,3	9,5	7,2	16,7	4,988023952
DCM 10	87,5	7,7	4,8	12,5	7
DCM 11	87,7	8	4,3	12,3	7,130081301
DCM 12	80,9	9,2	9,9	19,1	4,235602094
DCM 13	87,7	9,4	2,9	12,3	7,130081301
DCM 14	89,3	5,3	5,4	10,7	8,345794393
DCM 15	90	3	7	10	9
DCM 16	70,8	26,5	2,7	29,2	2,424657534
DCM 17	78,1	9,8	12,1	21,9	3,566210046
DCM 18	82,9	7,3	9,9	17,2	4,819767442
DCM 19	84	11,8	4,2	16	5,25
DCM 20	81,8	10,1	8,1	18,2	4,494505495
DCM 21	89,1	7,4	3,5	10,9	8,174311927
DCM 22	80,2	8,1	11,7	19,8	4,050505051
DCM 23	83,7	6,2	10,1	16,3	5,134969325
DCM 24	83,6	7	9,4	16,4	5,097560976
DCM 25	86,2	5	8,8	13,8	6,246376812
DCM 26	85,3	8,1	6,6	14,7	5,802721088
DCM 27	58,9	26,9	14,2	41,1	1,433090024
DCM 28	82,1	12	5,9	17,9	4,586592179
DCM 29	79,2	14,5	6,3	20,8	3,807692308
DCM 30	73,9	22,3	7,8	30,1	2,455149502
DCM 31	89,2	6,1	1,7	7,8	11,43589744
DCM 32	90,3	6,2	3,5	9,7	9,309278351
DCM 33	82	11,5	6,5	18	4,555555556
DCM 34	86,5	7,8	5,7	13,5	6,407407407
DCM 35	81,6	12,7	5,7	18,4	4,434782609
DCM 36	96,1	3	0,9	3,9	24,64102564
DCM 37	78,2	7,8	14	21,8	3,587155963
DCM 38	81,8	12,8	5,4	18,2	4,494505495
DCM 39	84,7	11,2	4,1	15,3	5,535947712
DCM 40	93,5	4,2	2,3	6,5	14,38461538

8.3 Hämodynamikparameter von Myokarditis-Patienten

Nummer	HI	LVEDP	EF	SVI	EDVI	ESVI	EDD	ANT-ratio
MC 1			28	42	152	109		2,48432056
MC 2	2	10	36	40	115	74	70	2,10559006
MC 3	4	10	88	88	79	90	43	5,41025641
MC 4	5	12	74	53	72	18	47	2,03030303
MC 5	3	12	46	64	139	74	55	3,90196078
MC 6		16	72	70	97	27	40	8,17431193
MC 7	3	18						6,24637681
MC 8	3	8					50	6,24637681
MC 9	2	28	18	35	194	158	67	4,34759358
MC 10	2	18	28	56	203	146	65	2,05810398
MC 11		12	70	94	136	41	54	7,69565217
MC 12	4	15	67	70	103	33	61	4,55555556
MC 13		12	26	59	228	168	72	0,87617261
MC 14	3	16	75	61	82	20	53	6,69230769
MC 15	6	8	76	70	93	22	52	1,92397661
MC 16		26					50	3,21940928
MC 17	2	32	26	69	271	202	77	1,87356322
MC 18		12	74				52,5	2,83141762
MC 19	5,1	10	76	50	104	25	51	8,34579439
MC 20	3	26	40	50	126	75	62	1,94985251
MC 21	3	6	59	46	79	32	55	5,75675676
MC 22	3	8	31	52	170	117	68	3,20168067
MC 23	3	6						2,81679389
MC 24	3	13	69	130	189	59	61	2,6101083
MC 25	3	19	32	82	265	183	70	3,11522634
MC 26	2	3	75	68	90	22	50	7,84955752
MC 27	1	24	21	46	224	178	77	2,4965035
MC 28	4	6	26	18	70	52	68	4,74712644
MC 29	3	4	65	82	126	44	58	3,34782609
MC 30	2,5	15,5					67,5	6,46268657
MC 31	3	10	66	63	96	32		4,29100529
MC 32	2,9	15,54					60	6,35294118
MC 33	2	24	16	34	211	177	72,5	2,83846154
MC 34	4	14	45	56	124	68	70	8,00900901
MC 35	3	5	59	52	88		54,5	3,14107884
MC 36	2,7	20					52	1,24215247
MC 37	3,6	17	81	66	82	15	50	1,34192037
MC 38	3	12					49	1,17391304
MC 39	3	10						3,11522634
MC 40	8	32	31	41	133	92	54	1,63852243
MC 41	2	24					63	1,45700246
MC 42	3	30	25	34	137	103	65	4,31914894
MC 43	2	28	23	73	320	147	86	3,75714286
MC 44		15,5						2,86100386
MC 45	2,6	11						1,77777778
MC 46	2	25	19	31	170	138	74	1,07039337
MC 47	4	8	76	67	88	21	47	3,6728972
MC 48	2,2	8					54	4,10204082
MC 49	3	18	31	45	144	99	50	2,08641975
MC 50	3,9	15	85	73	86	13	43	11,195122
MC 51	2	26	28	94	335	241		3,11522634
MC 52		15,5					46	2,55871886
MC 53	2	10	50	46	92	46	75	2,30794702
MC 54	3	7	56	62	110	48	54	2,95256917
MC 55	3	16	76	26	35	8	41	1,90697674

MC 56	5	6						1,62467192
MC 57	3	36	33	55	167	112	68	3,95049505
MC 58	3	8	41	50	122	72	63	7,19672131
MC 59	5	7						1,2195122
MC 60	2	16	49	97	199	101	65	1,26950355
MC 61	5	12	34	53	155	102	50	2,08641975
MC 62	3	12	33	46	139	93	67	7,20491803

8.4 Hämodynamikparameter bei DCM-Patienten

Nummer	HI	LVEDP	EF	SVI	EDVI	ESVI	EDD
DCM 1	3		31	26	84	58	65
DCM 2		12	70	65	94	28	
DCM 3	3	8	54	54	99	45	
DCM 4		16	37	84	226	141	
DCM 5	3,5						52
DCM 6	3	9					
DCM 7	3	5	67	49	73	24	48
DCM 8							55
DCM 9	4	9					
DCM 10	2,5						
DCM 11							
DCM 12	4	6	51	48	95	46	50
DCM 13	3	8	52	58	112	54	52
DCM 14	2	28	29	76	262	186	
DCM 15	2,6	10					55
DCM 16	1		26	53	207	154	
DCM 17		20					
DCM 18	2	10	41	70	171	101	72,5
DCM 19	3		11				
DCM 20		18	26	36	143	106	60
DCM 21	2	9	33	33	135	90	60
DCM 22	3	7					70
DCM 23	2	12					
DCM 24	3		29	33	115	81	
DCM 25	2	24	48	52	109	57	
DCM 26	2	6					
DCM 27	3,7						55
DCM 28	4	6	69	65	95	29	57,5
DCM 29			18	54	297	242	
DCM 30	4	6					59
DCM 31	4	16	45	157	348	191	
DCM 32	3	6	88	84	96	11	
DCM 33	4	10	78	40	52	11	50
DCM 34	5	9					
DCM 35		12					
DCM 36	3	10	29	41	141	100	
DCM 37	2,6						68
DCM 38							
DCM 39		20	30	53	177	124	68
DCM 40	3		23				

8.5 Histologieverteilung bei Myokarditispatienten

Nummer	CD2	CD3	CD4	CD8	UHL	Beurteilung	ANT-ratio
MC 1							2,48432056
MC 2	2,8	2,8	1	1,9		p	2,10559006
MC 3	1,3	0,7	0,25	0,75		p	5,41025641
MC 4	4,3	3,9		2	2,2	p	2,03030303
MC 5	2,1	2,3	0,9	1	0,1	p	3,90196078
MC 6	1	0,8	0	0,2	0	p	8,17431193
MC 7	0,9	0,6				n	6,24637681
MC 8	1,1	1,9	0	0	0	n	6,24637681
MC 9	1,1	1,8	1,5	0,7	0,7	n	4,34759358
MC 10	0,8	1,25	0,05	1,4	1,1	n	2,05810398
MC 11	1,8	1,7	0,5	1,5	0,3	p	7,69565217
MC 12	5,6	5,7	2,3	2,8	2,5	p	4,55555556
MC 13	2,2	1,5	0,7	1	0,5	p	0,87617261
MC 14	1	1,3	0,9	0,4	0,5	n	6,69230769
MC 15	1,5	1,8	1	1,2	2	p	1,92397661
MC 16	1,3	1,7				p	3,21940928
MC 17	2,5	2,7	1,2	2	0,6	p	1,87356322
MC 18	2,2	2,3	0,9	1,3	1,3	p	2,83141763
MC 19	1,5	1	0,5	0,5	1,6	p	8,34579439
MC 20	1	0,7				n	1,94985251
MC 21	0,8	1,5	0,3	0,2	0,4	n	5,75675676
MC 22	1,6	2,5	2	2,2	1,2	p	3,20168067
MC 23	1	0,5	0,5	1,3	0,1	n	2,81679389
MC 24	7,4	7,6	3,3	5		p	2,6101083
MC 25	2,1	2	0,3	0,4	0,6	p	3,11522634
MC 26	0,6	1				p	7,84955752
MC 27	2,1	2	0,9	1,1		p	2,4965035
MC 28	1,7	2	0,2	1	0,8	p	4,74712644
MC 29	3	4,3	1,5	3,5	0	p	3,34782609
MC 30	0,1	0,5	0,4	0	0,6	p	6,46268657
MC 31	1,8	2,9	0,7	0,8	1,2	p	4,29100529
MC 32	1,3	1,6	0,9	0,9	1,5	p	6,35294118
MC 33		2,8				p	2,83846154
MC 34	1,1	1,5	0,8	1,5	0,8	n	8,00900901
MC 35	1	1	0,8	1,5	1	p	3,14107884
MC 36	1,8	2	0	0,5	0,5	p	1,24215247
MC 37	20	20	20	20	20	p	1,34192038
MC 38	3,4	3,2	0,4	1	2,1	p	1,17391304
MC 39	2,4	4,2	0,3	2,2	2,4	p	3,11522634
MC 40	1,7	2,1			0,5	p	1,63852243
MC 41	0,5	0,7	0,2	0,3	0,9	p	1,45700246
MC 42	2,2	2,3	0,3	2,2	0,8	p	4,31914894
MC 43	3	3,1	1,5	1,8	0,5	p	3,75714286
MC 44	1	1,2	0,3	0,5	0,8	n	2,86100386
MC 45	1,8	1,7	0,4	0,8	0,8	p	1,77777778
MC 46	0,6	0,8	0,1	0,8	0,3	n	1,07039338
MC 47	1,5	0,9	0,3	0,4	0,1	n	3,6728972
MC 48	2,3	2,1	0,2	0,2	0,6	p	4,10204082
MC 49	0,6	1,2	0	0		p	2,08641975
MC 50	1,7	1,2	0,6	0,3	0,2	p	11,195122
MC 51	2	1,6	0,4	1,2		p	3,11522634
MC 52	3,3	3,9	2	2	1,9	p	2,55871886
MC 53	1,3	0,3		0,2		n	2,30794702
MC 54	1,8	2,2				p	2,95256917

MC 55	1,8	1,7	0,4	1,1	0,6	p	1,90697674
MC 56	9	12	2,4	9	8,4	p	1,62467192
MC 57	0,8	0,7	0,3	0,4	0,1	p	3,95049505
MC 58	1,5	1,5	0,3	0,9	0,7	p	7,19672131
MC 59	2,4	2	0,8	0,7	0,2	p	1,2195122
MC 60	5	4,6				p	1,26950355
MC 61	0,8	1	0,5	1,8	0,5	n	2,08641975
MC 62	1,3	0,8	1,1	0,4	0,6	p	7,20491803

8.6 Histologieverteilung bei DCM-Patienten

Nummer	CD2	CD3	CD4	CD8	UHL	Beur	ANT-ratio
DCM 1	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	n	9,63829787
DCM 2	0,7	0,5	0,3	0,2	0,4	n	7,69565217
DCM 3	4	4,3	0,8	2,1	1,2	p	9,30927835
DCM 4	0,6	1,1	0	0,8	0,3	n	5,41025641
DCM 5	1	1,2	0,2	0,2	0,5	n	6,46268657
DCM 6	0,8	0,8				n	6,51879699
DCM 7	1	0,8	0,5	0,4	0	n	10,2359551
DCM 8	0,3	0,7	0	0,2	0	n	5,41025641
DCM 9	1,2	0,7	0,1	0,8	0,4	n	4,98802395
DCM 10	1,3	0,6	0,5	0	0,2	n	7
DCM 11	0,9	1,8	0,7	0,4	0,4	p	7,1300813
DCM 12	0,7	0,2	0	0	0,3	n	4,23560209
DCM 13	0,5	1				n	7,1300813
DCM 14	0,6	0,5				n	8,34579439
DCM 15	0,35		0,1	0,3	0,3	n	9
DCM 16	0,5	1,2				n	2,42465753
DCM 17	1,2	0,9	0,9	0,7	0,7		3,56621005
DCM 18	0,6	0,6				n	4,81976744
DCM 19	0,5	0,5	0,2	0,2	0	n	5,25
DCM 20							4,4945055
DCM 21	0,8	0,8				n	8,17431193
DCM 22	0,1	0,8	0,2	0	0,3	n	4,05050505
DCM 23	0,8	0,9	0	0,3	0,1	n	5,13496933
DCM 24	0,4	0,5	0	0,2	0,2	n	5,09756098
DCM 25							6,24637681
DCM 26	0,2		0	0,1	0,1	n	5,80272109
DCM 27	1,2	1,2	0,7	0,3	0,1	n	1,43309002
DCM 28	0,5	0,5	0,5	0,1	0,2	n	4,58659218
DCM 29	0,5	0,7				n	3,80769231
DCM 30	0,6	0,7	0,6	0,5	0,3	n	2,4551495
DCM 31	0,2	0,7	0	0,3	0,3	n	11,4358974
DCM 32							9,30927835
DCM 33							4,55555556
DCM 34	0,7	0,7	0,7			n	6,40740741
DCM 35	1,4	1,5	0,3	1,1		n	4,43478261
DCM 36	0,6	0,7				n	24,6410256
DCM 37							3,58715596
DCM 38	1,4	1,1	1,6	0,4	1,1	n	4,4945055
DCM 39	1	1,4				n	5,53594771
DCM 40	0,8	0,8	0,7	0,6	0	n	14,3846154

8.7 Krankheitsdauer bei MC- und DCM-Patienten

Nummer	Anamnesedauer in Monaten	Nummer	Anamnesedauer in Monaten
MC 1	5	DCM 1	25
MC 2	5	DCM 2	136
MC 3	5	DCM 3	156
MC 4	40	DCM 4	5
MC 5	13	DCM 5	26
MC 6	87	DCM 6	72
MC 7	14	DCM 7	8
MC 8	73	DCM 8	1
MC 9	22	DCM 9	9
MC 10	51	DCM 10	120
MC 11	51	DCM 11	9
MC 12	3	DCM 12	12
MC 13	35	DCM 13	143
MC 14	7	DCM 14	2
MC 15	1	DCM 15	9
MC 16	51	DCM 16	46
MC 17	110	DCM 17	5
MC 18	24	DCM 18	28
MC 19	36	DCM 19	5
MC 20	2	DCM 20	32
MC 21	27	DCM 21	2
MC 22		DCM 22	51
MC 23	72	DCM 23	8
MC 24	26	DCM 24	5
MC 25	20	DCM 25	48
MC 26	1	DCM 26	8
MC 27	37	DCM 27	8
MC 28	92	DCM 28	10
MC 29	33	DCM 29	16
MC 30	23	DCM 30	6
MC 31	134	DCM 31	4
MC 32	30	DCM 32	11
MC 33	1	DCM 33	12
MC 34	36	DCM 34	30
MC 35	6	DCM 35	69
MC 36	12	DCM 36	31
MC 37	2	DCM 37	17
MC 38	1	DCM 38	80
MC 39	19	DCM 39	190
MC 40	15	DCM 40	5
MC 41	18		
MC 42	4		
MC 43	11		
MC 44	3		
MC 45			
MC 46	6		
MC 47	2		
MC 48	5		
MC 49	3		
MC 50	5		
MC 51	25		
MC 52			
MC 53	91		
MC 54	118		

MC 55	48
MC 56	1
MC 57	56
MC 58	2
MC 59	1
MC 60	126
MC 61	40
MC 62	20

8.8 Krankheitsgrade bei MC- und DCM-Patienten

Nummer	Krgrad-Gruppe	Nummer	Krgrad-Gruppe
MC 1	III	DCM 1	II
MC 2	III	DCM 2	III
MC 3	III	DCM 3	II
MC 4	III	DCM 4	III
MC 5	III	DCM 5	II
MC 6	I	DCM 6	II
MC 7	II	DCM 7	II
MC 8	II	DCM 8	I
MC 9	III	DCM 9	III
MC 10	II	DCM 10	II
MC 11	III	DCM 11	II
MC 12	II	DCM 12	III
MC 13	III	DCM 13	III
MC 14	III	DCM 14	I
MC 15	III	DCM 15	II
MC 16	III	DCM 16	II
MC 17	II	DCM 17	II
MC 18	II	DCM 18	III
MC 19	III	DCM 19	II
MC 20	I	DCM 20	II
MC 21	II	DCM 21	II
MC 22	III	DCM 22	III
MC 23	II	DCM 23	I
MC 24	II	DCM 24	III
MC 25	III	DCM 25	III
MC 26	II	DCM 26	III
MC 27	III	DCM 27	I
MC 28	II	DCM 28	II
MC 29	III	DCM 29	II
MC 30	III	DCM 30	III
MC 31	III	DCM 31	II
MC 32	III	DCM 32	III
MC 33	I	DCM 33	III
MC 34	II	DCM 34	II
MC 35	III	DCM 35	II
MC 36	II	DCM 36	III
MC 37	I	DCM 37	I
MC 38	II	DCM 38	I
MC 39	II	DCM 39	II
MC 40	III	DCM 40	II
MC 41	III		
MC 42	II		
MC 43	II		
MC 44	II		
MC 45	II		
MC 46	III		
MC 47	I		
MC 48	III		
MC 49	I		
MC 50	I		
MC 51	II		
MC 52	III		
MC 53	III		
MC 54	I		

MC 55	III
MC 56	II
MC 57	III
MC 58	II
MC 59	I
MC 60	I
MC 61	I
MC 62	III

8.9 Virusbefall bei MC- und DCM-Patienten

Nummer	Virus	Nummer	Virus
MC 1	nein	DCM 1	ja
MC 2	nein	DCM 2	ja
MC 3	ja	DCM 3	ja
MC 4	nein	DCM 4	nein
MC 5	ja	DCM 5	nein
MC 6	ja	DCM 6	nein
MC 7	ja	DCM 7	nein
MC 8	ja	DCM 8	nein
MC 9	ja	DCM 9	nein
MC 10	ja	DCM 10	ja
MC 11	nein	DCM 11	nein
MC 12	ja	DCM 12	ja
MC 13	nein	DCM 13	ja
MC 14	nein	DCM 14	nein
MC 15	nein	DCM 15	nein
MC 16	nein	DCM 16	nein
MC 17	ja	DCM 17	nein
MC 18	nein	DCM 18	ja
MC 19	nein	DCM 19	nein
MC 20	ja	DCM 20	nein
MC 21	ja	DCM 21	ja
MC 22	nein	DCM 22	ja
MC 23	ja	DCM 23	ja
MC 24	nein	DCM 24	nein
MC 25	nein	DCM 25	nein
MC 26	nein	DCM 26	ja
MC 27	nein	DCM 27	nein
MC 28	ja	DCM 28	nein
MC 29	ja	DCM 29	ja
MC 30	nein	DCM 30	nein
MC 31	nein	DCM 31	ja
MC 32	nein	DCM 32	nein
MC 33	nein	DCM 33	nein
MC 34	ja	DCM 34	nein
MC 35	nein	DCM 35	nein
MC 36	ja	DCM 36	ja
MC 37	ja	DCM 37	nein
MC 38	nein	DCM 38	ja
MC 39	ja	DCM 39	ja
MC 40	nein	DCM 40	nein
MC 41	nein		
MC 42	nein		
MC 43	nein		
MC 44	nein		
MC 45	nein		
MC 46	nein		
MC 47	ja		
MC 48	ja		
MC 49	ja		
MC 50	ja		
MC 51	ja		
MC 52	ja		
MC 53	nein		
MC 54	nein		
MC 55	nein		

MC 56	nein
MC 57	ja
MC 58	ja
MC 59	nein
MC 60	nein
MC 61	nein
MC 62	ja

8.10 Puffer, Lösungen und Medien für die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden:

Auftragspuffer (DNA):	0,25%	Bromophenolblau
	0,25%	Xylene Cyanol FF
	15%	Ficoll (Typ 400, Fa. Pharmacia)
Auftragspuffer (RNA):	50%	Glycerin
	0,01M	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
	0,4%	Bromophenolblau
	autoklavieren, bei -20°C lagern	
Denaturierungslösung:	0,5M	NaOH
	1,5M	NaCl
H-Puffer:	3M	LiCl
	6M	Harnstoff
	0,2 mg/ml	Heparin
	10mM	Na-Acetat, pH 5,0
Hybridisierungslösung:	500 ml	Gold Buffer (Fa. Amersham)
	5%	Blockierungsreagenz (Fa. Amersham)
	0,5M	NaCl
Kinasepuffer:	500mM	Tris-HCL, pH 7,5
	100mM	MgCl ₂
	1mM	Spermidin
	1mM	EDTA
	autoklavieren, danach Zugabe von	
	50mM	DTT
Laufpuffer:	30g	Tris
	144g	Glycin
	ad 1 l	

Phenol-Chloroform:	250g	Phenol
	250ml	Chloroform
	500ml	SP-SDS
	lösen, danach Zugabe von	
	500mg	Hydroxyquinolin
PCR-Puffer (10x):	100mM	Tris, pH 8,8
	500mM	KCl
	15mM	MgCl ₂
	autoklavieren, danach Zugabe von	
	0,1%	Gelatine
RT-Puffer:	250mM	Tris, pH 8,3
	15mM	MgCl ₂
	350mM	KCl
	Lagerung bei -20°C	
SP-SDS:	50mM	Na-Acetat
	1%	Dodecylsulfat, Na-Salz (SDS)
20x SSC:	3M	NaCl
	0,3M	Natriumcitrat, pH 7,0
STE-Puffer:	20mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100mM	NaCl
	19mM	EDTA
TAE (50x):	2M	Tris-Acetat
	5M	EDTA
W-Puffer:	3M	LiCl
	6M	Harnstoff
	autoklaviert; Lagerung bei 4°C	

RT-Mix	- 4-µl 5xRT-Puffer (Gibco BRC) - 1µl RNAsin (Boehringer) - 8µl dNTP (alle zu gleichen Teilen) - 1µl Random Primer (1:5 verdünnt; 8ng) ■ 1µl MMLV-Reverse Transkriptase
PCR-Mix	- 5µl 10x PCR-Puffer - 0,02Mol 5`Primer</li> <li>- 0,02Mol 3`Primer - 2,5µl Taq-Polymerase (1:10 verdünnt) ■ 28,5µl Wasser
Ansatz für die radioaktive Oligonukleotidmarkierung	- 70ng Oligonukleotide (siehe Tabelle) - 2,5µl 1xKinasepuffer - 1µl T4-Polynukleotidkinase (Boehringer) - 5µl Gamma-P³²ATP (>5000Ci/mmol) ■ ad 25µl mit autoklaviertem aqua bidest.

8.11 Verwendete Nukleotide und Primer

8.11.1 Primersequenzen und verwendete Annealingtemperaturen

Spezifität	Annealing-temperatur	Primersequenzen
ANT gesamt ANT	57°C	5' CTG CTG CTG CAG GTC CAG CA 3' 5' CCT GAC TGC ATC ATC AT 3'
ANT 1 5' ANT 1 3'	60°C	5' CTG AGA GCG TCG AGC TGT CA 3' 5' CTC AAT GAA GCA TCT CTT C 3'
ANT 2 5' ANT 2 3'	55°C	5' CCG CAG CGC CGT AGT CAA A 3' 5' AGT CTG TCA AGA ATG CTC AA 3'
ANT 3 5' ANT 3 3'	70°C	5' CCG TTC TCC GGC TGT CCT CC 3' 5' GCC GGC CGC ACC GCC GGA GGC 3'

8.11.2 Nukleotidsequenz der zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide

Spezifität	Sequenz	Länge
ANT 1	5' GGC AAG GGC GCC GCC CAG CG 3'	20
ANT 2	5' GCT GGA GCT GAA AGG GAA TT 3'	20
ANT 3	5' ATC GTG GAC TGC ATT GTC CG 3'	20

8.11.3 Primersequenzen und verwendete Annealingtemperaturen

Spezifität	Annealingtemperatur	Primersequenzen
Enterovirus 5' Enterovirus 3'	60°C	5' CGG TAC CTT TGT GCG CCT GT 3' 5' CAG GCC GCC AAC GCA GCC 3'
β-Actin 5' β-Actin 3'	60°C	5' ATC ATG AAG TGT GAC GTG GAC ATC C 3' 5' AAC CGA CTG CTG TCA CCT TCA CC 3'

8.11.4 Nukleotidsequenz der zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide

Spezifität	Sequenz	Länge
Enterovirus	5' CGA AGT AGT TGG CCG GAT AAC 3'	21

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tanja Link-Ingenstau
Anschrift: Volmerswertherstr. 14, 41468 Neuss
Geburtsdatum: 13.02.1971
Geburtsort: Düsseldorf
Konfession: römisch katholisch
Familienstand: ledig
Eltern: Jürgen Ingenstau, Notar
Christa Ingenstau, geb. Drees, Hausfrau

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule Neuss
1981-1990 Marienberggymnasium Neuss
Abitur 1990

Hochschulbildung:

1990-1996 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Studiengang Humanmedizin
1992 Physikum
1993 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1996 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1997 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1996/1997 Marien-Hospital Düsseldorf, Wahlfach Radiologie

Tätigkeit als AIP:

Juli 1997 bis Ende 1998 in der chirurgischen und gefäßchirurgischen Abteilung des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss

Tätigkeit als Assistenzärztin:

Jan-März 1999 in der onkologischen Abteilung der Niederrheinklinik in Korschenbroich
seit April 1999 wieder in der chirurgischen und gefäßchirurgischen Abteilung des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss

Neuss, den 29.7.2001

Verantwortliche Faktoren für die veränderte kardiale Isoformexpression des Adeninnukleotidtranslokators bei Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie.

Herzmuskelentzündungen werden vorwiegend durch Enteroviren verursacht. Bei Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie, ein mögliches Folgestadium einer chronisch verlaufenden MC, kann es zu einer Verschiebung des Isoformexpressionsmusters des Adeninnukleotidtranslokators (ANT) kommen. Der ANT ist verantwortlich für den Transport von ADP und ATP über die innere Mitochondrienmembran und spielt somit eine wichtige Rolle im zellulären Energiestoffwechsel. Darüberhinaus ist er als Bindungspartner für pro- und antiapoptotische Regulationsproteine und als Bestandteil der „Permeability Transition Pore“ in den Apoptoseprozeß involviert. Die ANT-Isoformverschiebung, die im Herzgewebe von MC- und DCM-Patienten beobachtet werden kann, ist durch einen erhöhten ANT 1-, einen erniedrigten ANT 2- und einen unveränderten ANT 3-Anteil charakterisiert und führt zu einer erniedrigten ATP/ADP-Transportkapazität des ANT-Gesamtproteins im Mitochondrium. Tierversuche zeigten, daß eine eingeschränkte ANT-Funktion zu Herzerkrankungen führt.

Es stellte sich nun die Frage, welche Faktoren für die veränderte Isoformexpression verantwortlich gemacht werden können. Zur Klärung wurden hämodynamische, immunhistologische und virale Befunde mit der kardialen ANT-Isoformexpression von 62 Patienten mit dem Verdacht auf MC oder 40 Patienten mit DCM korreliert. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen hämodynamischen Daten und der ANT-Isoformexpression, so daß eine Volumen- oder Druckbelastung des Herzens als Triggermechanismus für die veränderte ANT-Verteilung ausgeschlossen werden kann.

Mittels PCR war es möglich, enterovirale RNA im Herzmuskelgewebe nachzuweisen. Bei 56% der viruspositiven MC-Patienten und sogar 100% der viruspositiven DCM-Patienten lag ein ANT-Isoformshift vor. Die Annahme der immunhistologischen Beteiligung erbrachte darüber hinaus, daß vor allem Patienten mit einer geringen oder gar keinen lymphozytären Infiltration, die eine aktive Immunantwort kennzeichnet, von einer veränderten ANT-Expression betroffen sind. 29 von 47 Patienten mit einer aktivierten zellulären Immunantwort besaßen hingegen eine normale ANT-Verteilung. Die nähere Untersuchung der viruspositiven Patienten mit normaler ANT-Expression zeigte, daß 10 von 12 dieser Patienten eine hohe T-Lymphozyteninfiltration ihres Biopsiematerials aufwiesen.

Verlaufsuntersuchungen ergaben, daß ein einmal erfolgter Isoformshift trotz Therapie bestehen bleibt. Patienten mit einer pathologischen ANT-Verteilung waren schlechter belastbar und therapierbar. Jene mit einer normalen ANT-Verteilung zeigten hingegen einen wesentlich leichteren Krankheitsverlauf.

Schlussfolgerung: Eine ANT-Isoformexpressionsänderung ist mit einer enteroviralen Infektion und einer unzureichenden zellulären Immunantwort verbunden. Eine kardiale Lymphozyteninfiltration als Ausdruck einer aktiven Immunantwort scheint möglicherweise durch Viruseliminierung protektiv auf die ANT-Expression zu wirken. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß der ANT in der Pathophysiologie der viralen Herzerkrankung eine signifikante Rolle spielt.